

UNIVERSITÉ MONTPELLIER I

Faculté de Médecine

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER I

Discipline : Parasitologie

Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Par

Anne POINSIGNON

Étude de la relation homme-vecteur.

**De l'identification à la validation de protéines salivaires comme
marqueur immunologique d'exposition aux piqûres
d'*Anopheles spp.* et de *Glossina spp.***

Soutenue le 1^{er} décembre 2008

Jury

C. BOURGOUIN, Directeur de Recherche, Institut Pasteur.

J-P. DEDET, Professeur, Université Montpellier 1.

G. DUVALLET, Professeur émérite, Université Montpellier 3.

F. REMOUÉ, Chargé de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement.

C. ROGIER, Professeur, Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées.

F. SIMONDON, Directeur de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux personnes sans qui "rien ne serait arrivé", aux personnes qui m'ont encadrée, encouragée et soutenue durant ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier très sincèrement Franck Remoué. Merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur, ta patience, ton dynamisme, et tes conseils qui m'ont été précieux. La qualité de ton encadrement tant sur le plan scientifique qu'humain m'a permis de tirer le meilleur de moi-même. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir encouragée. Sans oublier tous les très bons souvenirs du continent africain, de Dakar à Bobo-dioulasso en passant par Cotonou...

Je remercie particulièrement mon directeur de thèse François Simondon. J'ai été heureuse de pouvoir bénéficier de ta compétence et de ta rigueur scientifique. Merci de m'avoir accueillie au sein de l'unité "épidémiologie et prévention" de l'IRD, de m'avoir fait confiance, de m'avoir soutenue et de m'avoir permis de réaliser dans d'excellentes conditions l'ensemble de mes travaux de recherche.

Je remercie Christophe Rogier et Gérard Duvallet de me faire l'honneur d'apporter leur jugement expert sur ce travail.

Je remercie également Jean-Pierre Dedet, tout d'abord pour m'avoir admise dans la dernière promotion du DEA de Parasitologie de l'Université de Montpellier et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Catherine Bourguin qui a accepté de participer au jury de soutenance de ce mémoire.

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 : P. Grébaut, A. Garcia, D. Courtin, M. Cot, G. Cuny, C. Sokhna, JF Trape, H. Bassène, J. Ribeiro, B. Arcà.

Une thèse est le fruit d'un travail réalisé à plusieurs... Je remercie sincèrement Cheikh et Jules, ainsi que Marie pour leur précieuse aide et la bonne ambiance au laboratoire à Dakar.

Un grand merci à tous les collègues de l'UR024. Tout d'abord un grand merci à Sylvie de suivre l'évolution de mes travaux, pour tes précieux conseils et de ton enthousiasme

inaltérable. Un grand merci aux collègues Montpelliérains: Marie, Florie, Amandine, Sébastien, François, Kirsten, Denis, Roselyne, Annie et Annick.

J'adresse une très grande pensée à mes collègues Dakarois, à Pape, à Amady, à Tofène, à Jean sans oublier Cécile.

J'en profite pour remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer durant ces 3 années et avec qui les échanges humains ou scientifiques m'ont permis d'apprécier chaque instant.

Je remercie également tous les membres du *Mosquito Salivary Network*, pour nos discussions passionnantes autour de la salive des insectes! J'espère que ce réseau perdurera et que j'aurai l'occasion d'y participer de nouveau...

Un clin d'œil à mes amis de Gif, de Montpellier et de Dakar...

Une pensée particulière pour ma famille. Je remercie mes parents de m'avoir permis de poursuivre ces longues études et pour votre soutien permanent.

Enfin ma dernière pensée va à Arthur. Merci d'être là...

Table des matières

<i>Table des figures</i>	8 -
<i>Cadre des travaux de thèse</i>	10 -
<i>Introduction</i>	12 -
Première partie Généralités	16 -
<i>Chapitre 1</i>	
<i>La trypanosomiase humaine africaine & le paludisme</i>	17 -
1.1- Présentation des complexes pathogènes étudiés	18 -
1.1.1 - La trypanosomiase humaine africaine	18 -
La THA, une maladie ré-émergente et négligée	18 -
Symptomatologie de la THA	20 -
1.1.2 - Le paludisme	21 -
Le paludisme, un fléau pour l'Afrique	21 -
Symptomatologie du paludisme à <i>P. falciparum</i>	24 -
1.2 - Les protagonistes	28 -
1.2.1 - Les pathogènes	28 -
Les pathogènes à transmission vectorielle d'importance médicale	28 -
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	29 -
<i>Plasmodium falciparum</i>	31 -
1.2.2 - Les vecteurs	33 -
Les arthropodes hématophages vecteurs de pathogènes	33 -
Les glossines	35 -
Les anophèles d'Afrique	42 -
<i>Chapitre 2</i>	
<i>La lutte contre les maladies à transmission vectorielle et ses limites</i>	49 -
-	
2.1 - La réduction de la charge parasitaire	50 -
2.1.1 - Trypanosomiase Humaine Africaine	50 -
Dépistage et diagnostic	51 -
Traitement	53 -
2.1.2 - Paludisme	54 -
Diagnostic	54 -
Traitement	55 -
2.2 - La réduction des populations de vecteurs et du contact homme-vecteur	56 -
par la lutte anti-vecteur	56 -
2.2.1 - Lutte contre les populations de glossines	57 -
2.2.2 - Lutte contre les populations d'anophèles	59 -
2.3 - Stratégies préventives de transmission	62 -
2.3.1 - Vaccins	62 -
Vaccins anti-parasites	62 -
Vaccins anti-vecteurs	67 -
2.3.2 - Réduction du contact homme-vecteur	68 -
2.3.3 - Chimio prophylaxie	69 -

Chapitre 3:
De l'évaluation du risque d'exposition au risque d'infection..... - 71 -

3.1 - Evaluation du risque d'exposition	- 72 -
3.1.1 - Approche entomologique : évaluation de la densité des populations de vecteurs	- 72 -
3.1.2 - Approche sérologique.....	- 75 -
3.1.3 - Approche environnementale intégrée.....	- 75 -
3.2 - Évaluation du risque de transmission	- 76 -
3.2.1 - Indice de transmission entomologique.....	- 76 -
3.2.2 - Indice de transmission évalué chez homme.....	- 78 -

Chapitre 4.....
Diversité et fonctions des protéines salivaires..... - 81 -

4.1 - Propriétés pharmacologiques	- 84 -
4.1.1 - Inhibition de l'agrégation plaquettaire	- 84 -
4.1.2 - Inhibition de la coagulation	- 86 -
4.1.3 - Vasodilatation	- 89 -
4.1.4 - Inhibition de la réaction inflammatoire.....	- 91 -
4.1.5 - Les protéines de la Famille D7: à l'interface des réponses de l'homme. -	91 -
4.2 - Modulation de la réponse immune de l'hôte.....	- 92 -
4.3 - Autres rôles des protéines salivaires	- 92 -
4.4 - Modification de la composition salivaire.....	- 94 -
4.5 - Apport des techniques de bio-informatique dans l'étude du transcriptome des glandes salivaires d' <i>An. gambiae</i> et de <i>G. morsitans morsitans</i>	- 95 -
Description du sialome d' <i>An. gambiae</i>	- 96 -
Description du sialome de <i>Glossina spp.</i>	- 98 -

Chapitre 5
Relation immunologique homme-vecteur..... - 100 -

5.1 - Immunomodulation par la salive : de la réponse immune innée à l'adaptative. Conséquences sur la transmission des pathogènes?	- 102 -
5.2 - Une immunomodulation différente entre vecteurs?.....	- 105 -
5.3 - Influence de la salive sur la réponse immune anti-pathogène.....	- 105 -
5.4 - Effet d'une pré-exposition répétée aux antigènes salivaires des vecteurs sur le développement de l'infection	- 106 -
5.5 - Propriétés immunomodulatrices de la salive des glossines et des anophèles	- 107 -
5.6 - Approche vaccinale	- 108 -
5.7 - Réactions allergiques.....	- 111 -
5.8 - Marqueur immunologique d'exposition aux piqûres des vecteurs.....	- 111 -

Deuxième partie Résultats - 115 -

Chapitre 1.....
Vers l'identification d'un marqueur immuno-épidémiologique d'exposition aux piqûres de *Glossina spp.*..... - 116 -

1.1 - Particularités épidémiologiques de la trypanosomiase humaine africaine en République Démocratique du Congo.....	- 117 -
---	---------

1.2 - La réponse IgG spécifique aux extraits salivaires de glossine, un nouvel indicateur immunologique permettant d'identifier les individus exposés aux piqûres des glossines.....	- 120 -
1.3 - Vers l'identification de protéines salivaires immunogéniques candidates pour l'élaboration d'un marqueur d'exposition	- 126 -
<i>Chapitre 2</i>	
<i>Développement d'un marqueur immuno-épidémiologique d'exposition spécifique à Anopheles spp.</i>	<i>- 138 -</i>
2.1 - Épidémiologie du paludisme au Sénégal	- 139 -
2.2 - Identification du peptide gSG6-P1 comme marqueur immunologique d'exposition spécifique aux piqûres d' <i>Anopheles gambiae</i>	- 142 -
2.3 - Acquisition des réponses immunes IgM et IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 au cours de la petite enfance	- 154 -
<i>Chapitre 3</i>	
<i>Exemples d'application de marqueur d'exposition</i>	<i>- 159 -</i>
3.1 - gSG6-P1, un marqueur d'exposition dans des zones de faible densité anophélienne.....	- 160 -
3.2 - La réponse Ac spécifique de la salive d' <i>An. gambiae</i> , un critère d'efficacité dans l'évaluation de la LAV?	- 174 -
Exemple dans le cadre de la mise en place de moustiquaires imprégnées d'insecticides	
<i>Troisième partie Conclusions & Perspectives.....</i>	<i>- 188 -</i>
<i>Références Bibliographiques</i>	<i>-203-</i>
<i>Publications et Communications personnelles.....</i>	<i>-221-</i>

Table des figures

Figure 1. Mortalité attribuée aux maladies à transmission vectorielle (VBD).....	13 -
Figure 2. Système épidémiologique de transmission vectorielle.	14 -
Figure 3. Répartition des foyers trypaniques en Afrique.....	19 -
Figure 4. Répartition mondiale des zones impaludées.	22 -
Figure 5. Déterminants du complexe pathogène du paludisme et interactions.	23 -
Figure 6. Distribution de l'endémicité palustre.	24 -
Figure 7. Trypanosomes dans le sang (stade trypomastigote).....	29 -
Figure 8. Cycle de développement et biologie des trypanosomes pathogènes.....	30 -
Figure 9. Hématies parasitées par <i>P. falciparum</i>	31 -
Figure 10. Cycle biologique du <i>Plasmodium</i>	32 -
Figure 11. <i>Glossina palpalis</i>	35 -
Figure 12. Classification des glossines.....	36 -
Figure 13. Cycle biologique des glossines.	37 -
Figure 14. Aire de géo-distribution des différentes espèces de <i>Glossina spp.</i>	39 -
Figure 15. Aire de géo-distribution des différentes espèces de <i>G. fuscipes</i> (A), <i>G. palpalis</i> (B) et <i>G. tachinoides</i> (C).	40 -
Figure 16. Aire de géo-distribution de <i>Glossina morsitans spp.</i>	41 -
Figure 17. <i>Anopheles gambiae</i>	42 -
Figure 18. Cycle biologique des anophèles.....	43 -
Figure 19. Géo-distribution des vecteurs <i>Anopheles gambiae s.l.</i>	45 -
Figure 20. Gîtes potentiels d' <i>An. gambiae s.l.</i>	45 -
Figure 21. Géo-distribution des vecteurs <i>Anopheles funestus</i>	46 -
Figure 22. Dépistage et diagnostic de phase de la THA.....	52 -
Figure 23. Distribution mondiale des échecs thérapeutiques à la chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et méfloquine.....	55 -
Figure 24. L'écran bleu/noir/bleu.....	58 -
Figure 25. Piège biconique proche d'un point d'eau.....	58 -
Figure 26. Représentation schématique des antigènes candidats vaccins.	65 -
Figure 27. Paire de glandes salivaires d' <i>An. gambiae</i> adulte femelle.	82 -
Figure 28. Formation du thrombus blanc.	84 -
Figure 29. Effet de la salive des arthropodes vecteurs sur l'agrégation plaquettaire.....	85 -
Figure 30. Voies de coagulation chez l'homme.	87 -
Figure 31. Effet de la salive des arthropodes vecteurs sur la cascade de coagulation.....	88 -
Figure 32. Protocoles (A) et stratégies (B) utilisés pour isoler et caractériser les protéines ou les ADNc salivaires des insectes vecteurs.....	96 -

Figure 33. Répartition des protéines des glandes salivaires d' <i>An. gambiae</i> en fonction de leur localisation cellulaire (A) et de leur fonction biologique (B).....	98 -
Figure 34. Effet immunomodulateur de la salive d'arthropodes hématophages sur la réponse immunitaire innée et adaptative de l'homme.	104 -
Figure 35. Régions en situation d'hyper endémie en RDC.....	118 -
Figure 36. Nombre de nouveaux cas humains de THA détectés en RDC entre 1926 et 2003.	119 -
Figure 37. Géo-distribution des espèces de glossines en RDC..	120 -
Figure 38. Séance de salivation de glossines.....	126 -
Figure 39. Stratégies permettant l'identification de candidats salivaires pour l'élaboration de marqueur d'exposition.....	127 -
Figure 40. Prévalence de la morbidité palustre en fonction des régions au Sénégal en 2007. Les villages de Niakhar et de Ndiop sont indiqués.	140 -
Figure 41. Alignements des séquences de gSG6 chez 3 espèces d' <i>Anopheles</i> , <i>An. stephensi</i> (AS), <i>An. funestus</i> (AF) et <i>An. gambiae</i> (AG).....	144 -
Figure 42. Evaluation de l'immunogénicité des protéines gSG6 et gSG7 recombinantes chez six enfants (a-f) résidant en zone de transmission palustre à Niakhar (Sénégal).	145 -
Figure 43. Evolution individuelle des réponses IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 pour les dix enfants au cours de leurs deux premières années de vie.....	155 -
Figure 44. Evaluation des réponses IgM et IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 en fonction des classes d'âge des enfants.....	156 -
Figure 45. <i>An. gambiae</i> aggressiveness according to exposure group during season of exposure. -	165 -
Figure 46. Evaluation of IgG Ab specifics to <i>An. gambiae</i> gSG6-P1 according to the age of the children from a low endemic area.	166 -
Figure 47. IgG antibodies to <i>An. gambiae</i> gSG6-P1 during the season of exposure in studied population (A) and according to the exposure group (B).....	167 -
Figure 48. Individual increase of IgG antibodies to <i>An. gambiae</i> gSG6-P1 during the season of exposure.	168 -
Figure 49. Situation géographique de l'Angola.	176 -
Figure 50. Technique de salivation de moustiques.	177 -
Figure 51. Variations mensuelles des densités agressives d' <i>An. gambiae</i>	179 -
Figure 52. Évolution de la prévalence parasitaire (A) et des densités parasitaires.....	181 -
Figure 53. Évaluation des réponses IgG anti-salive d' <i>An. gambiae</i> chez les individus pour chaque passage.	183 -
Figure 54. Schéma récapitulatif de la stratégie développée: de l'identification aux applications de marqueurs salivaires immunologiques d'exposition aux piqûres des glossines et des anophèles. -	198 -

Cadre des travaux de thèse

Laboratoire d'accueil

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été menés dans le cadre d'une thèse scientifique de la Faculté de médecine de l'université Montpellier 1, discipline Parasitologie. Elle a été réalisée sous le financement d'une allocation de recherche du Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie puis par un financement de Mr François Lacoste (Fonds Inkermann).

Cette thèse a été réalisée au sein du Projet EpiVect (Epidémiologie des Vecteurs) développé dans l'unité UR024 « Epidémiologie et Prévention » de l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement), projet initié il y a 6 ans sous la direction de François Simondon et de Franck Remoué.

L'objectif principal de ce projet est d'identifier et de valider des protéines salivaires d'insectes comme biomarqueurs immunologiques permettant d'évaluer le niveau d'exposition des individus et des populations à la piqure d'insectes vecteurs de pathogènes (*Anopheles*, *Glossina*, *Aedes*, *Culex*...). Dans le cadre de cette thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à deux vecteurs de parasites protozoaires, chacun présentant des particularités écologiques, entomologiques et épidémiologiques i) les moustiques femelles *Anopheles* responsables de la transmission de *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme et ii) aux glossines responsables de la transmission de *Trypanosoma brucei gambiense*, agent de la maladie du sommeil (THA).

Le laboratoire du projet EpiVect est implanté à la fois à Montpellier (Centre IRD-Agropolis) et à Dakar (Campus international UCAD-IRD de Hann) au Sénégal où j'ai eu l'opportunité de réaliser une partie de mes travaux (mars 2007 - mars 2008).

IRD – UR024
Épidémiologie et Prévention
911 avenue Agropolis
BP 64501
34394 Montpellier Cedex 5
France

Centre IRD de Hann – UR024
Épidémiologie et Prévention
Route des Pères Maristes
BP 1386
CP 18524 - Dakar
Sénégal

Collaborations principales

Les différents projets initiés dans le cadre de ces travaux de thèse n'auraient pu être réalisés sans la collaboration indispensable de membres d'autres équipes IRD: UR010 (André Garcia, David Courtin, Michel Cot); UR077 (Jean-François Trappe, Cheikh Sokhna, Hubert Bassène) qui ont participé aux analyses des cohortes de personnes résidant en zone d'endémie palustre (Sénégal) ou trypanique (République Démocratique du Congo).

L'élaboration du projet "glossine" et le recueil des extraits salivaires totaux de glossines n'auraient pu avoir lieu sans les conseils de Pascal Grébaut de l'UR 177. Par ailleurs, le projet portant sur la protéine gSG6 d'*An. gambiae* a été initié en collaboration avec José Ribeiro (NIH- Bethesda, USA) et Bruno Arcà (Université Naples et Rome, Italie) et s'est élargi par notre collaboration avec Christophe Rogier (IMTSSA, Le Pharo, Marseille).

Le projet EpiVect-*Anopheles* est réalisé en étroite collaboration avec l'UR016 (Didier Fontenille, Jean-Marc Hougard, Vincent Corbel, Fabrice Chandre, Pierre Carnevale).

Introduction

Les maladies à transmission vectorielle représentent 17% des maladies infectieuses et figurent parmi les plus importantes pathologies en santé humaine, tant par la morbidité que par la mortalité qu'elles entraînent (Figure 1). Ces maladies sont principalement répandues dans les régions tropicales où elles sont à la fois les causes et les conséquences de sous-développement, leur impact en santé publique constitue un frein à l'éducation des enfants et au développement économique des pays.

Parmi les maladies à transmission vectorielle, les maladies parasitaires telles que le paludisme et les trypanosomiasis humaines africaines (THA) constituent pour les hommes des menaces constantes de santé publique et souvent multiples dans de vastes zones géographiques.

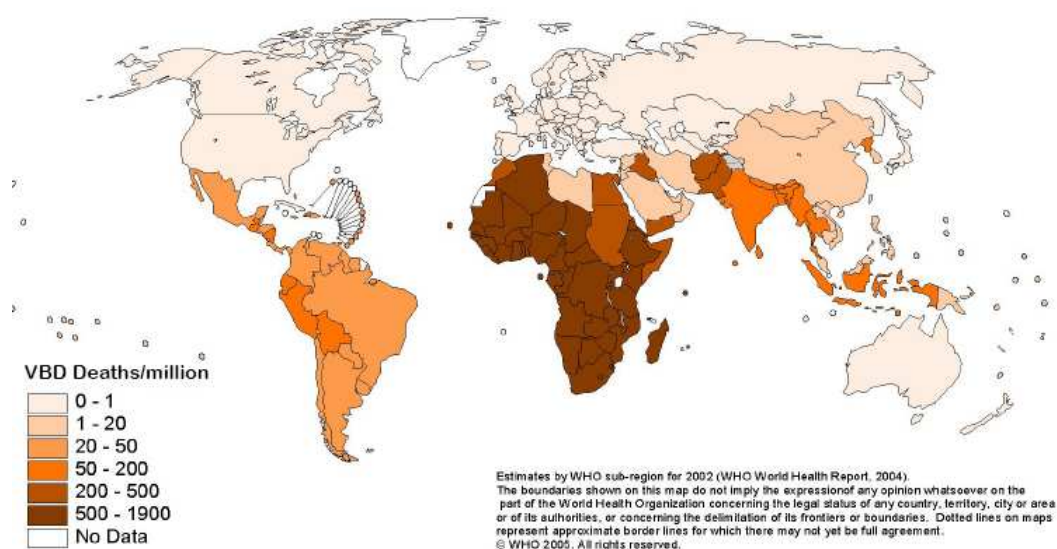


Figure 1. Mortalité attribuée aux maladies à transmission vectorielle (VBD).
D'après WHO.

La transmission d'un agent infectieux entre deux hôtes vertébrés par un arthropode vecteur représente un mode de transmission complexe mais très efficace. L'accomplissement du cycle des pathogènes exige une évolution à travers un hôte invertébré, l'arthropode, avant qu'il ne soit inoculé par ce vecteur à un hôte humain réceptif. L'homme, le parasite, le vecteur sont les trois éléments d'un cycle interactif, ils interagissent au niveau de systèmes épidémiologiques et bio-écologiques complexes. Les caractéristiques de ces systèmes sont spécifiques au complexe vectoriel et influencent directement la dynamique de transmission de la maladie. La figure 2 permet d'appréhender l'ensemble des phénomènes qui participent au fonctionnement d'un système épidémiologique théorique.

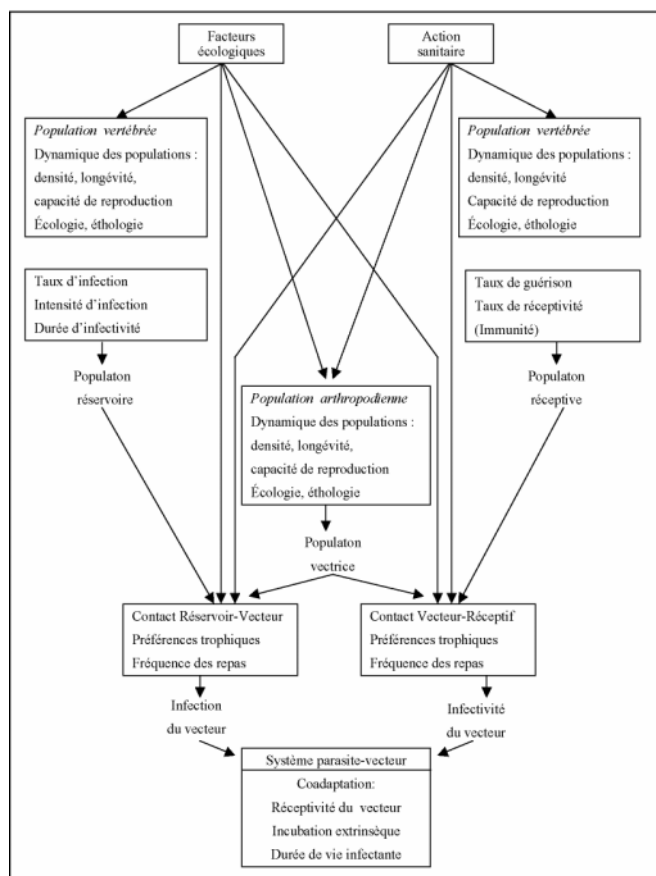


Figure 2. Système épidémiologique de transmission vectorielle.
D'après (Rodhain F 1985).

Une particularité de la lutte contre ces maladies est qu'elle doit faire face à deux partenaires: l'agent pathogène et son vecteur arthropode. Les stratégies visant à limiter la transmission de ces maladies, associant des mesures de lutte anti-vectorielle (piégeage, insecticide, protection individuelle) et de lutte contre les parasites par le dépistage et la mise sous traitement des personnes infectées, se multiplient pour limiter la morbidité et la mortalité. Cependant, l'émergence et la diffusion des résistances des parasites aux médicaments et des vecteurs aux insecticides (Hemingway *et al.* 2002) altèrent l'efficacité de chacune de ces stratégies. Les recherches sur l'élaboration de vaccins restent une voie privilégiée mais la grande diversité génétique des parasites constitue un frein. Actuellement aucun vaccin n'est disponible dans le domaine de la THA et du paludisme.

La morbidité de ces parasitoses est directement liée à l'exposition des personnes aux piqûres des insectes vecteurs. Actuellement, l'évaluation de l'exposition des populations humaines aux piqûres de ces insectes vecteurs est basée sur des méthodes entomologiques (captures par pièges, appât humain...). Mais ces méthodes de références présentent des

limites de sensibilité et des biais. Il apparaît urgent de développer de nouveaux outils de lutte et de prévention pour un meilleur contrôle de ces maladies.

Les plasmodiums et les trypanosomes sont injectés par la salive des insectes vecteurs chez l'homme au cours d'un repas sanguin. Les protéines salivaires, par leurs propriétés pharmacologiques et immunologiques, sont indispensables au bon déroulement du repas de sang. L'étude de ces protéines salivaires permet de mieux comprendre les relations homme-vecteur et pourrait aboutir au développement de nouvelles stratégies de lutte (vaccin, allergie, marqueur d'exposition). Depuis une dizaine d'années est né le concept d'élaborer des marqueurs d'exposition aux piqûres des insectes vecteurs, et donc au risque de transmission des pathogènes, en exploitant les propriétés immunogéniques de ces protéines, i.e. la propriété d'induire chez l'homme une synthèse d'anticorps spécifiques.

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent directement dans le contexte du développement de nouveaux outils épidémiologiques complémentaires permettant d'évaluer l'exposition individuelle aux piqûres des glossines et des anophèles dans le cadre de la lutte contre le paludisme et de la THA.

Nous présenterons d'abord la situation actuelle de ces maladies en Afrique chez l'homme et les connaissances déjà acquises (identité, fonctions et propriétés) dans le domaine des protéines salivaires des arthropodes vecteurs. Nous présenterons ensuite notre travail de thèse qui s'articule autour de 3 axes complémentaires : l'identification, la validation et les applications potentielles de marqueurs salivaires permettant d'apprécier le niveau d'exposition des populations humaines aux piqûres des glossines et des anophèles.

Concernant les glossines, l'objectif premier était d'évaluer si la réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux pouvait être un marqueur séro-épidémiologique permettant de discriminer une personne exposée ou non aux piqûres des glossines. Ceci ayant été vérifié, dans un deuxième objectif, nous avons comparé la composition salivaire, sialome et immunosialome, de plusieurs espèces de glossine et leur immunogénicité chez des individus exposés ou non afin de détecter, par des méthodes d'immuno-empreintes, des candidats salivaires potentiels pour l'élaboration d'un marqueur d'exposition aux glossines.

Concernant les vecteurs du paludisme, l'objectif premier était d'identifier une protéine salivaire spécifique du genre *Anopheles* et de la valider en tant que marqueur d'exposition. Le deuxième objectif était de valider ce marqueur dans des contextes épidémiologiques illustrant les applications possibles d'un tel marqueur.

Première partie

Généralités

Chapitre 1

La trypanosomiase humaine africaine & le paludisme

1.1- Présentation des complexes pathogènes étudiés

1.1.1 - La trypanosomiase humaine africaine

La THA, une maladie ré-émergente et négligée

La Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) communément appelée maladie du sommeil est provoquée par des protozoaires du complexe *Trypanosoma brucei*.

Deux sous-espèces de *Trypanosoma brucei* peuvent infecter l'homme :

- *T. brucei rhodesiense* est l'agent responsable d'une anthroponose de caractère aigu sévissant en Afrique de l'est.

- *T. brucei gambiense* est l'agent responsable de la forme chronique de la maladie du sommeil. Il est spécifique de l'homme et se retrouve uniquement en Afrique centrale et de l'ouest. Il est responsable de 90% des infections recensées à travers le continent africain.

La THA se retrouve exclusivement dans les régions d'Afrique sub-saharienne où se répartissent les glossines ou mouches tsé-tsé, les uniques vecteurs de ces trypanosomes. Elle a une distribution spatiale focale, elle sévit au niveau de foyers trypaniques localisés. Elle est rarement retrouvée de manière endémique au niveau de grandes étendues géographiques. Les foyers de la THA ne recouvrent pas l'ensemble de la zone sub-saharienne (Figure 3) ; leurs limites dépendent de l'existence de conditions épidémiologiques (biotiques et abiotiques) favorables au développement des glossines et à l'apparition ou au maintien de la maladie.

La THA est une maladie parasitaire vieille de plusieurs siècles, à l'origine d'épidémies qui ont ravagé l'Afrique sub-saharienne par vagues successives pendant au moins 200 ans. Une grave épidémie éclata dans les années 1920, et la maladie du sommeil se révéla un obstacle majeur au développement économique et social de l'Afrique centrale et de l'est. Pour enrayer cette épidémie, des programmes de lutte furent mis en place avec des équipes médicales mobiles qui menaient des campagnes intensives de dépistage systématique. Au milieu des années 1960, la maladie avait pratiquement été éliminée du continent africain. Mais le fléchissement des efforts de lutte avec l'interruption des prospections médicales, aggravé par le déclin économique, l'instabilité politique, la détérioration des systèmes de santé, les guerres endémiques dans les pays les plus exposés et les déplacements de populations infectées, ont engendré une réactivation des foyers historiques.

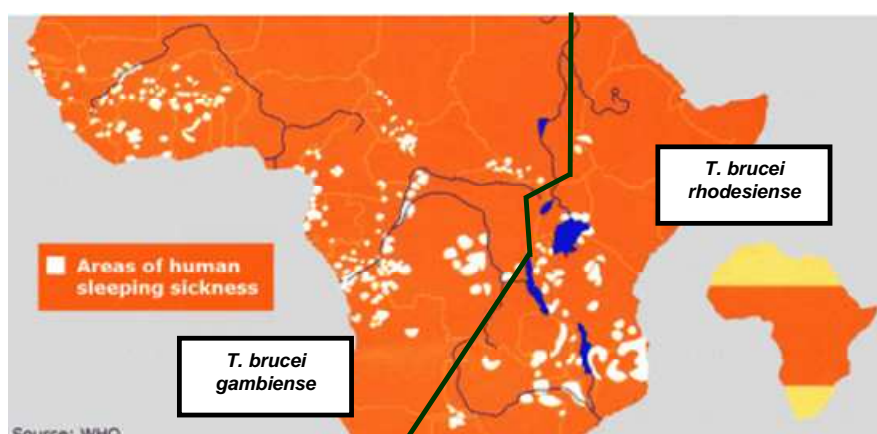


Figure 3. Répartition des foyers trypaniques en Afrique.
D'après WHO.

Aujourd'hui, l'Afrique sub-saharienne est une fois encore ravagée par une épidémie qui a commencé dans les années 1970. La maladie du sommeil est maintenant endémique au sein de 260 foyers répartis dans 36 pays d'Afrique sub-saharienne, où plus de 60 millions de personnes sont exposées (WHO 2001). L'OMS estime à plus de 400.000 le nombre de personnes infectées par des trypanosomes et moins de 10% d'entre elles reçoivent un traitement adapté. Des prospections médicales par des équipes mobiles permettent de dépister les malades mais seulement 3 à 4 millions de personnes restent sous surveillance. Néanmoins les efforts de lutte déployés dans ce domaine sont encourageants, depuis 1997, on a observé une diminution de 69% dans le nombre de nouveaux cas déclarés (Simarro *et al.* 2008).

La THA se pose comme un problème majeur de santé publique en Afrique centrale particulièrement en République Démocratique du Congo (RDC), en Ouganda, au Soudan (Moore *et al.* 2001) et en Angola (Stanghellini *et al.* 2001) qui rassemblent à eux seuls 90% des nouveaux cas déclarés à travers le continent africain (Simarro *et al.* 2008). Pour ces pays on parle d'hyper endémie. Dans certains villages des régions de Bandundu et de l'Equateur en RDC, près de 90 % des habitants sont touchés.

D'après l'OMS, la THA est considérée comme une maladie «négligée». Cette maladie "du bout de la piste" est le plus souvent rencontrée dans des zones rurales reculées où les établissements de santé ne possèdent pas le personnel et le matériel nécessaires pour établir le diagnostic. Ne touchant que les populations pauvres, cette maladie a traditionnellement souffert du peu d'intérêt commercial à mettre au point des médicaments et des vaccins destinés à des marchés trop pauvres pour les acheter.

Remarque : Une troisième sous-espèce de trypanosome, *T. brucei brucei* est responsable d'une zoonose strictement animale appelée couramment le « Nagana ». C'est une cause importante de maladie chez les bovins domestiques qui constituent l'une des principales sources de subsistance en Afrique rurale. Elle entraîne la mort de plus de 3 millions de têtes de bétail chaque année, privant ainsi les familles de lait, de viande (source essentielle de protéines) et de force de trait. En raison de l'épidémie actuelle, des villages et de vastes étendues de terres fertiles ont été abandonnés. Certains insectes piqueurs (stomoxes, tabanidés) peuvent assurer une transmission mécanique non négligeable de certains trypanosomes animaux.

Symptomatologie de la THA

L'infection chez l'homme est initiée par la piqûre d'une glossine infectée. Les trypanosomes métacycliques sont déposés sous la peau et injectés dans la circulation sanguine et lymphatique. Au niveau du site de piqûre, il y a apparition d'un chancre d'inoculation qui passe souvent inaperçu sur la peau de couleur sombre.

L'évolution clinique de la THA permet de distinguer deux phases : la phase lymphatico-sanguine et la phase méningo-encéphalique. Pendant la première phase, généralement asymptomatique, les trypanosomes se multiplient dans le sang et dans le système lymphatique de l'hôte humain. Les anticorps (Ac) circulants vont alors lyser cette première population de trypanosomes. Une mutation survient chez quelques parasites qui modifient la structure de leur antigène de surface leur permettant d'échapper à l'action des Ac. La multiplication des mutants (ou variants antigéniques) va donner une deuxième population parasitaire qui à son tour subira la lyse. Cette phase peut durer des années dans le cas de la trypanosomiase à *T. b. gambiense* (Chimelli *et al.* 1997). Les symptômes spécifiques à ce stade sont peu nombreux, fièvre irrégulière, céphalées, signes cutanés et ganglions palpables (Jannin *et al.* 1993). Il en résulte que les personnes infectées, et donc en mesure de transmettre l'infection, ne sont généralement ni repérées ni traitées, assurant ainsi le rôle de réservoir parasitaire.

La seconde phase débute lorsque l'espacement des poussées parasitémiques s'accompagne d'une diminution du nombre de parasites dans le sang et d'un envahissement du compartiment extra-vasculaire. Les parasites sont alors présents dans tous les organes mais le cœur et le système nerveux central sont les plus atteints. La trypanosomiase à *T. b. rhodesiense* est beaucoup plus virulente et peut évoluer vers la seconde phase en l'espace de quelques semaines ou de quelques mois. Pour les deux formes, la seconde phase est caractérisée par une altération de l'état mental, par l'apparition de troubles sensoriels, de troubles de la parole

et de difficultés motrices, ainsi que par des perturbations du cycle du sommeil. En l'absence de traitement, la maladie entraîne invariablement la cachexie, la somnolence, le coma puis la mort.

Les animaux domestiques comme le porc et le chien pourraient servir de réservoirs de *T. brucei gambiense* pour l'homme. Pour les animaux sauvages, le Guib harnaché pourrait héberger des trypanosomes, cette antilope a tendance à vivre à proximité de l'homme (synanthropisme) (Mehlitz *et al.* 1982). Mais le réservoir animal semble avoir un impact mineur sur la transmission vers l'homme.

Dans le reste du manuscrit et ceci en relation avec les travaux dans le cadre de cette thèse, nous considérerons uniquement les données relatives à la trypanosomiase humaine africaine de symptomatologie chronique provoquée par *T. b. gambiense*.

1.1.2 - Le paludisme

Le paludisme, un fléau pour l'Afrique

Le paludisme demeure la maladie à transmission vectorielle la plus répandue à travers le monde et la plus meurtrière. Cette parasitose est essentiellement présente dans les pays tropicaux d'Amérique Latine, d'Asie mais majoritairement d'Afrique (Figure 4) où les conditions climatiques sont particulièrement favorables au développement des moustiques *Anopheles*, les uniques vecteurs des *Plasmodium*. Il existe environ deux cents espèces de *Plasmodium* qui peuvent infecter les reptiles, les oiseaux et les mammifères. Parmi les cinq espèces de *Plasmodium* qui infectent l'homme, *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus fréquente et la plus dangereuse qui induit les formes les plus graves avec la survenue d'accès cérébraux sévères responsables des décès palustres. Cette espèce est présente majoritairement en Afrique sub-saharienne chez 80 à 95% des personnes infectées. Sur près de 600 millions d'habitants en Afrique tropicale, 350 à 400 millions seraient des porteurs symptomatiques ou asymptomatiques de parasites (WHO 1996). L'épidémiologie des infections plasmodiales et la gravité de la maladie dépendent du niveau d'exposition à la transmission et du statut immunitaire des personnes infectées.

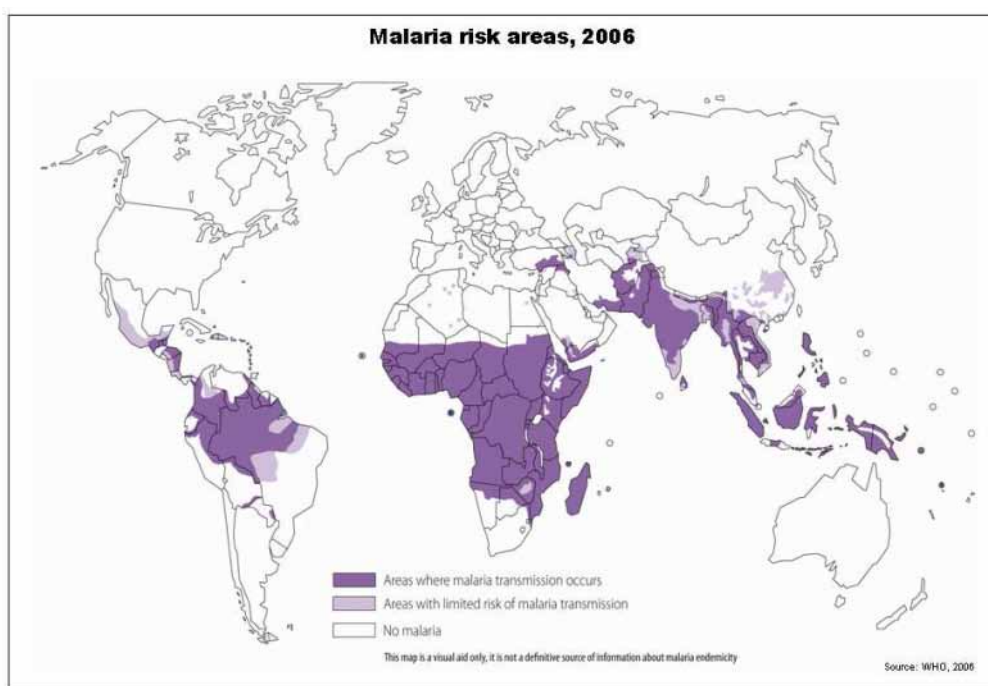


Figure 4. Répartition mondiale des zones impaludées.
D'après WHO.

La disparition du paludisme des régions tempérées au début du XX^{ème} siècle a ramené son aire de distribution à la ceinture tropicale et subtropicale entre le 30° de latitude nord et le 30° de latitude sud. Depuis quelques années, une extension du paludisme est observée dans de nouvelles régions (Afrique du Sud (le Sueur *et al.* 1996)) ainsi que sa réapparition dans certaines zones où il avait été éradiqué (Kenya (Shanks *et al.* 1999)). Les causes majeures de résurgence sont le développement de la résistance du parasite aux médicaments (Greenwood *et al.* 2002) et celle du moustique aux insecticides (Hemingway *et al.* 2002), la détérioration des programmes de contrôle (Guerin *et al.* 2002) et l'augmentation des migrations de populations (Martens *et al.* 2000).

De nos jours, le paludisme est endémique dans 109 pays et près de 3.3 milliards de personnes (soit 50% de la population mondiale) sont exposées à cette maladie. Chaque année 35 millions de cas sont déclarés officiellement mais les estimations révèlent 200 à 300 millions de cas cliniques par an (WHO 2008). Le paludisme à *P. falciparum* est responsable de 1 million de décès par an, en particulier chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes. Près de 90 % des cas de décès touchent les pays de l'Afrique sub-saharienne où le complexe *Anopheles gambiae* est le principal vecteur et où la maladie fait sérieusement obstacle au développement économique et social. L'épidémiologie du paludisme est

caractérisée par une forte hétérogénéité spatiale. En effet, les dynamiques de transmission peuvent varier entre deux villages proches géographiquement (Rogier *et al.* 1999).

Des facteurs ayant trait aux 3 protagonistes peuvent influencer la transmission : a) les caractéristiques génétiques et biologiques des parasites, b) la sensibilité génétique, immunologique et comportementale de l'homme, c) la distribution et la capacité vectorielle des vecteurs ainsi que les conditions locales (environnement, contexte socio-économique et méthodes de lutte) (Molineaux 1988). La figure 5 représente les interactions entre les trois protagonistes homme/*Anopheles*/*Plasmodium* et le milieu dans lequel le complexe pathogène évolue.

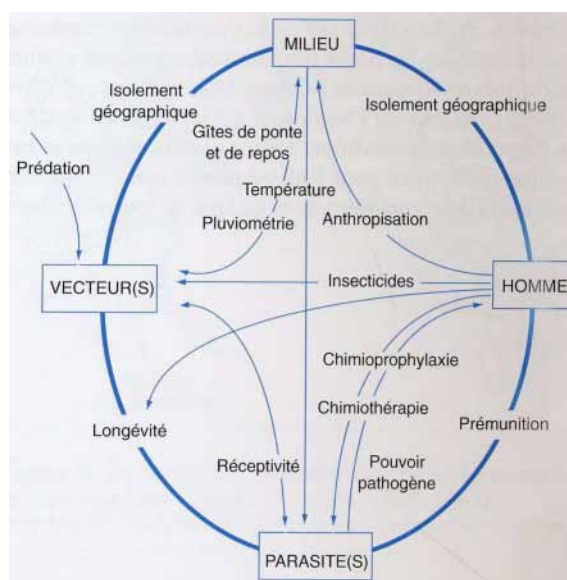


Figure 5. Déterminants du complexe pathogène du paludisme et interactions.
D'après (Mouchet *et al.* 2004).

Les différentes zones impaludées peuvent être classifiées suivant le statut épidémiologique de la transmission tel que sa périodicité (stable ou instable) et son intensité (évalué par la prévalence parasitaire). Les zones de paludisme stable sont classiquement caractérisées par une transmission généralement élevée et une saison de transmission longue voir pérenne. Le vecteur est très anthropophile et a une durée de vie longue. Au niveau des zones de paludisme instable, la transmission est généralement saisonnière et varie d'une année à l'autre. Des poussées épidémiques peuvent se produire.

On évalue également l'intensité de transmission à partir du nombre de piqûres infectantes reçues par l'homme dans un intervalle de temps défini. Ceci est exprimé par l'EIR (Entomologic Inoculation Rate). Il n'existe pas de classification des zones endémiques à partir

de l'EIR mais une relation étroite entre l'intensité de la transmission et le taux d'endémicité a été constatée (Killeen *et al.* 2000):

Hypo-endémicité : $EIR < 10$ piqûres infectantes/homme/an

Méso-endémicité : $10 \leq EIR < 50$ piqûres infectantes/homme/an

Hyper-endémicité : $50 \leq EIR < 100$ piqûres infectantes/homme/an

Holo-endémicité : $EIR \geq 100$ piqûres infectantes/homme/an

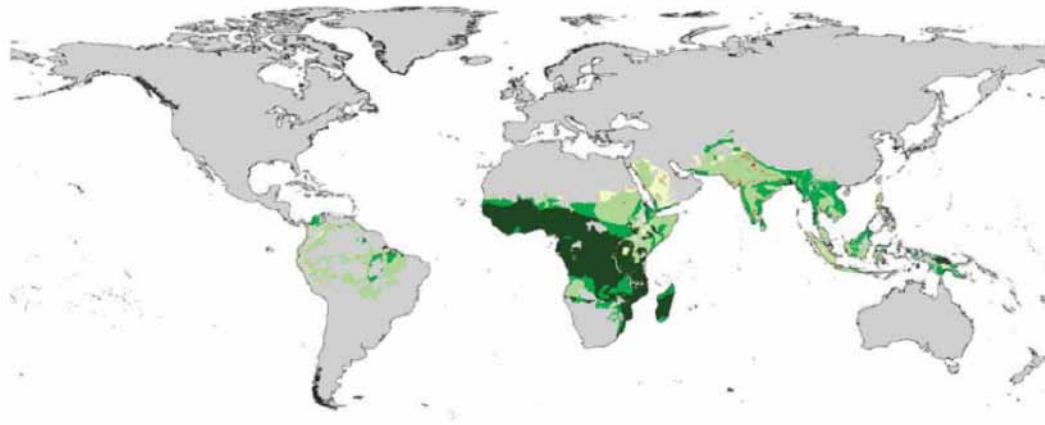


Figure 6. Distribution de l'endémicité palustre.

■ hyperendémie, Prévalence (P) > 50%, ■ mésoendémie, $11 < P < 50\%$, ■ hypoendémie, $P < 10\%$, ■ représente 6% de la population à risque, ■ zone en dehors des limites de transmission.

D'après (Snow *et al.* 2005).

Dans la région afro-tropicale, le paludisme stable, holo- et hyper-endémique touche au moins 60% de la population d'Afrique de l'ouest, centrale et orientale (Figure 6); la morbidité clinique survient majoritairement chez les enfants et la mortalité plus particulièrement chez ceux de 6 mois à 4 ans. En altitude et dans les zones arides, les indices diminuent et deviennent méso-endémique ou hypo-endémique; des situations épidémiques peuvent apparaître et toutes les classes d'âge sont alors touchées.

Symptomatologie du paludisme à *P. falciparum*

Tous les hommes sont sensibles à *P. falciparum*, mais la symptomatologie du paludisme dépend de la virulence de la souche de *Plasmodium* et du niveau d'immunité acquis par l'individu infecté. Par ailleurs, des facteurs génétiques pourraient conditionner la sensibilité des individus à l'infection plasmodiale (Kwiatkowski 1999). Le risque de cas grave pour l'homme ne semble pas proportionnel au degré de transmission. En effet une faible

mortalité palustre est observée dans des régions où la transmission est intense et permanente alors que des cas graves ont souvent été relevés dans des zones de paludisme instable et notamment lors d'épidémies. Ce phénomène semble lié à l'acquisition différente de l'immunité anti-palustre en fonction du degré de transmission des foyers.

La sensibilité du sujet au paludisme diminue avec l'âge. En zone d'endémie stable, après 5 ans, les accès graves sont rares et à partir de 10-15 ans les accès simples deviennent de plus en plus bénins. Là aussi, l'immunité spécifique semble jouer un rôle primordial comme le soulignait déjà Ross en 1911: « *Le sang de ceux qui survivent produit graduellement quelque chose qui a le pouvoir de réduire et peut-être d'arrêter l'invasion parasitaire* ».

Développement de l'immunité de prémunition

Une des conséquences des relations «homme/parasite/vecteur» est l'acquisition, par les populations humaines exposées, d'une immunité anti-palustre progressive, éphémère et incomplète, dite «de prémunition» (Sergent 1950). C'est un état d'immunité relative traduisant un équilibre hôte-parasite après plusieurs années d'exposition si la transmission est constante et relativement élevée. Cette immunité protège d'abord contre la mortalité et les formes graves palustres, puis contre les accès palustres simples en diminuant leur incidence plutôt que leur gravité et enfin en réduisant la durée et le niveau des infections par les stades sanguins. Cet équilibre 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 2^{ème} et 3^{ème} trimestre de la grossesse (Deloron *et al.* 1992). L'immunité de prémunition demande plusieurs années pour s'installer et est entretenue par des stimulations antigéniques dues à des infections palustres et à l'exposition aux piqûres anophéliennes répétées (Struik *et al.* 2004). Le développement de cette immunité de prémunition est dépendant du contexte épidémiologique, de la saisonnalité et de l'intensité de transmission au niveau de la zone géographique. Elle apparaît d'autant plus rapidement que la transmission est importante et permanente. Mais le développement de la prémunition n'empêche pas le portage de parasites faisant des sujets semi-immuns d'excellents "réservoirs" de parasites. Dans certaines régions sèches, de paludisme instable, la transmission fluctue considérablement d'une saison et d'une année à l'autre, cela retardant l'acquisition de l'immunité. Cette situation est rencontrée dans la plus grande partie de l'Afrique sub-saharienne.

Accès 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. 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. L'évolution mène à une phase d'état donnant lieu à une symptomatologie dont la périodicité est évocatrice ; il s'agit d'un accès fébrile, précédé de symptômes évoquant un épisode grippal, qui se caractérise par la succession de trois stades frissons - chaleur - sueurs. On observe parfois une hépatomégalie et une splénomégalie.

Les accès de primo invasion sont rarement observés chez les nourrissons de moins de 5 mois (Bruce-Chwatt 1952) qui présentent des parasitémies sans signe clinique (Kitua *et al.* 1996). Un accès dû à *P. falciparum* peut à tout moment se transformer en accès grave surtout chez les enfants et les personnes non immunes.

Accès sévère

Une parasitémie élevée semble être une composante nécessaire à la sévérité de l'accès. Des mécanismes distincts caractérisent deux formes de complications pathologiques : l'anémie sévère et l'accès cérébral, appelé aussi accès pernicieux ou neuropaludisme. Il représente probablement la première cause d'encéphalopathie non traumatique au monde (Newton *et al.* 2000) et est l'expression la plus fréquente du paludisme grave en zone d'endémie.

- Anémie sévère

Dans les régions hyper endémiques, où le nombre de piqûres infectantes par homme et par an dépasse la centaine, l'anémie sévère est beaucoup plus fréquente que l'accès cérébral. 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

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 *et al.* 2001). Le paludisme asymptomatique serait également responsable d'une baisse des facultés cognitives des enfants scolarisés (Al Serouri *et al.* 2000).

Le neuropaludisme se caractérise par une perte progressive de conscience aboutissant à un coma. Sans traitement, l'évolution peut être mortelle en 72 heures. Une prise en charge immédiate et adaptée (perfusion de quinine) permet un rapide rétablissement. 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. Des manifestations viscérales et systémiques peuvent être associées. On observe essentiellement une hypoglycémie (facteur aggravant renforcé par l'utilisation de la quinine hyperinsulinémiante), une anémie, un oedème pulmonaire, une hépatomégalie, une splénomégalie et une insuffisance rénale fonctionnelle ou organique.

La caractéristique principale de l'accès cérébral est l'obstruction des capillaires et des veinules par les hématies parasitées. La séquestration des hématies parasitées décrite dans la théorie mécanique est connue depuis 1894, soit 18 ans après la découverte de l'agent pathogène du paludisme par Laveran. Elle est essentiellement intracérébrale, mais peut s'observer dans la plupart des organes (WHO 1990). 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 *et al.* 1992), la cytoadhérence à l'origine de la séquestration parasitaire, conduit à différents phénomènes: blocage des micro-vaisseaux, hypoxie, sécrétion de cytokines pro inflammatoires, aboutissant à la destruction de la barrière endothéliale cérébrale. Cette séquestration met en jeu trois mécanismes : l'auto-agglutination, la formation de rosettes et la cytoadhérence. La formation de rosette 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 gazeux 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 parasitaires spécifiques (PfEMP1, protéine parasitaire à la surface du globule rouge) 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).

1.2 - Les protagonistes

1.2.1 - Les pathogènes

Les pathogènes à transmission vectorielle d'importance médicale

De nombreux micro-organismes ont sélectionné au cours de leur évolution un mode de dissémination utilisant un arthropode vecteur. Ce mode de transmission est l'un des plus complexes et des plus efficaces.

Il est estimé à environ 110 le nombre d'arbovirus (de l'anglais "arthropod-borne virus") pathogènes pour l'homme. Ces virus sont morphologiquement hétérogènes et appartiennent à plusieurs familles distinctes : *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* et *Bunyaviridae*. Les plus importants en santé publique humaine sont présents généralement en milieux tropicaux et sont principalement transmis par les moustiques (fièvre jaune, dengue, fièvre de la Vallée du Rift...) et les tiques (fièvre à tiques et encéphalites).

Parmi les bactéries transmises par un vecteur, un premier ensemble est constitué par les *Rickettsia* qui sont généralement transmises par les poux (typhus exanthématique), les puces et les tiques. Un second ensemble de bactéries comprend les spirochètes du genre *Borrelia* dont la plus répandue est *B. burgdorferi* responsable de la maladie de Lyme, transmise par les tiques. L'agent de la peste, *Yersinia pestis* est transmis par les puces.

Des protozoaires sont également transmis par des insectes hématophages. Les plus répandus sont les *Plasmodiums*, dont 4 espèces sont responsables du paludisme humain. Ils sont transmis uniquement par les anophèles femelles. Parmi les autres protozoaires les *Babesia* sont transmis par les tiques, les leishmanies par les phlébotomes. Il existe une vingtaine d'espèces de trypanosomes infectant divers vertébrés mais seules 2 espèces distinctes de trypanosomes sont susceptibles d'infecter l'homme : *Trypanosoma brucei* spp.

qui est transmis par la salive de glossines infectées (Trypanosomiasés Africaines) et ceux dont la transmission est assurée en Amérique tropicale, par les déjections des réduves ou triatomes (*T. cruzi*, agent de la maladie de Chagas).

Enfin, les filaires sont les seuls helminthes parasites à être propagés par un arthropode vecteur. Les filarioses lymphatiques de l'homme sont disséminées par des moustiques de la famille des *Culicidae* (*Aedes spp.*, *Culex spp.* et *Anopheles spp.*), les onchocerques par les simulies et les Loa d'Afrique par des tabanidés.

Trypanosoma brucei gambiense

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés sanguicoles exoérythrocytaires de l'ordre des *Kinetoplastidae* caractérisés par la présence à l'intérieur de leur mitochondrie unique d'un kinétoplaste, structure composée essentiellement d'ADN (Figure 7).

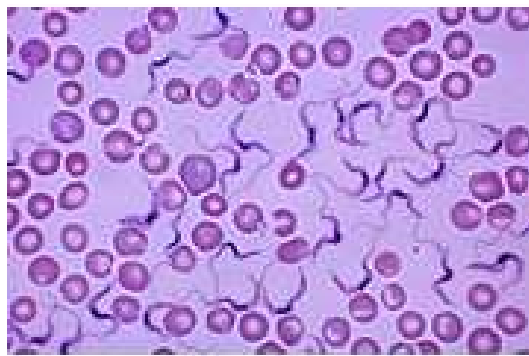


Figure 7. Trypanosomes dans le sang (stade trypomastigote).

Cycle évolutif

Les trypanosomes présentent un cycle biologique complexe qui inclut différentes formes morphologiques. Le cycle parasitaire du trypanosome africain est représenté exclusivement par des étapes extracellulaires (Figure 8).

Les trypanosomes ingérés par l'insecte vecteur au cours d'un repas sanguin sur un hôte infecté se transforment dans l'intestin moyen de la glossine en trypomastigotes procycliques (forme non infectante) et se multiplient par scissiparité. Ils quittent l'intestin, se transforment en épimastigotes puis migrent vers les glandes salivaires où ils se transforment en trypomastigotes métacycliques entourés d'un manteau protéique antigénique correspondant à la forme infectante pour l'homme. Les trypanosomes sont alors susceptibles d'être inoculés à un mammifère au niveau du tissu cutané par la piqûre du vecteur. Le temps de maturation chez la glossine est de 21 jours. Plusieurs centaines de trypanosomes peuvent être transmis en

une seule piqûre mais un seul suffit pour induire une infection chez l'homme. Un chancre d'inoculation se forme au niveau de la peau. Les parasites entrent alors dans le système lymphatique et passent dans la circulation sanguine où ils se transforment en trypomastigotes circulants dans le sang leur permettant de diffuser vers d'autres emplacements dans tout l'organisme (cœur, système nerveux central). Ils peuvent atteindre d'autres fluides biologiques et continuent de se répliquer par scissiparité. Le passage par les parasites de la barrière hémato-méningée sera responsable de la deuxième phase clinique de la maladie.

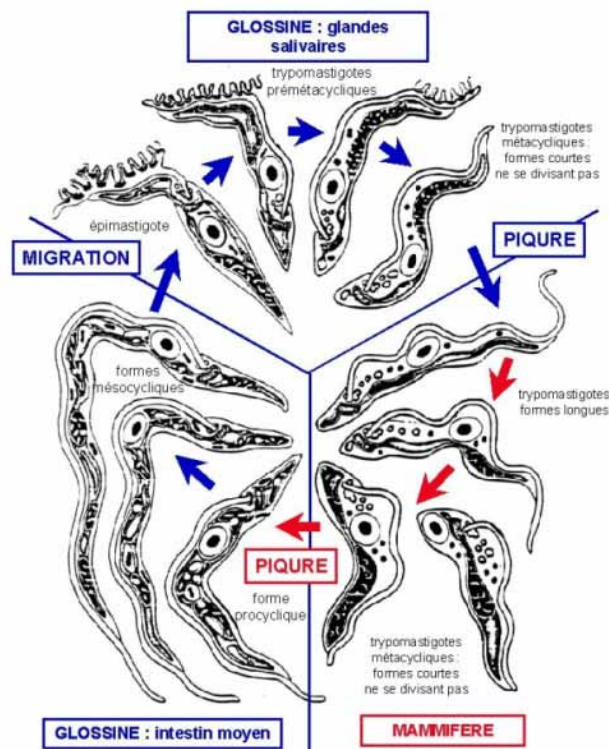


Figure 8. Cycle de développement et biologie des trypanosomes pathogènes.
D'après (Vickerman 1985).

Une mouche tsé-tsé va alors s'infecter par des trypomastigotes circulants en prenant un repas de sang sur un mammifère infecté. Seule une glossine ténérale peut s'infecter. En effet, chez la jeune glossine, la membrane péritrophique ne peut pas recevoir toute la quantité de sang et donc une partie du repas sanguin et donc de trypanosomes reste au niveau du jabot. Là ils subissent une transformation qui les protégera du milieu intestinal qui leur est hostile. En effet au niveau de l'intestin se trouve des lectines qui sont responsables de la mort des trypanosomes procycliques.

Plasmodium falciparum

Les agents étiologiques du paludisme sont des parasites protozoaires de l'embranchement des *Apicomplexa* (protozoaires à appareil apical complexe), de l'ordre des *Haemosporidia*, et appartiennent au genre *Plasmodium*. Les plasmodiums sont des parasites intracellulaires obligatoires (Figure 9).

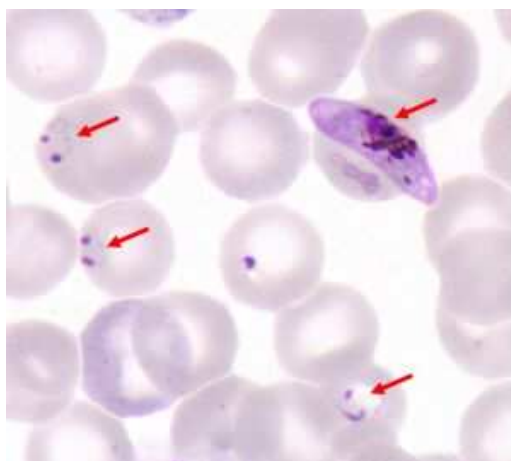


Figure 9. Hématies parasitées par *P. falciparum*

Cycle évolutif

Le cycle parasitaire chez l'anophèle commence quand un moustique femelle prend son repas sanguin sur un individu porteur de gamétocytes (Figure 10). Alors que les formes sanguines asexuées sont détruites par les enzymes digestives du moustique, les gamétocytes mâles et femelles s'échappent rapidement de leur enveloppe érythrocytaire en se transformant en micro-gamètes (après exflagellation pour les mâles) ou macro-gamètes (pour les femelles) dans l'intestin moyen du moustique. La fécondation va aboutir à la formation d'un zygote dans la demi-heure suivant la piqûre. Le zygote se transforme en ookinete allongé et mobile qui va migrer au travers de plusieurs cellules épithéliales du mésentère s'enkyster dans la paroi stomacale donnant un oocyste. La sporogonie qui succède permet la formation de sporozoïtes haploïdes. Au bout d'environ 10 jours, ces sporozoïtes passeront dans l'hémolymph, certains vont être détruits par des mécanismes immunitaires du moustique tandis que d'autres vont migrer passivement jusqu'aux glandes salivaires de l'*Anopheles* où ils se fixent. Ils s'agrègent dans les cavités situées dans la partie distale du système salivaire. Certains vont se détacher et migrer au niveau de la partie distale des canaux salivaires où ils seront transportés passivement vers la salive (Frischknecht *et al.* 2004) prêts à être transmis au prochain hôte, lors du prochain repas sanguin. Entre 20 et 100 sporozoïtes seront inoculés à

un hôte à l'occasion d'une nouvelle piqûre (Rickman *et al.* 1990). Le temps de maturation chez l'anophèle est directement dépendant de la température extérieure moyenne ; il s'effectue entre 6 et 20 jours (respectivement à 30 et à 20°C) avec une température minimale de 18°C nécessaire à la maturation.

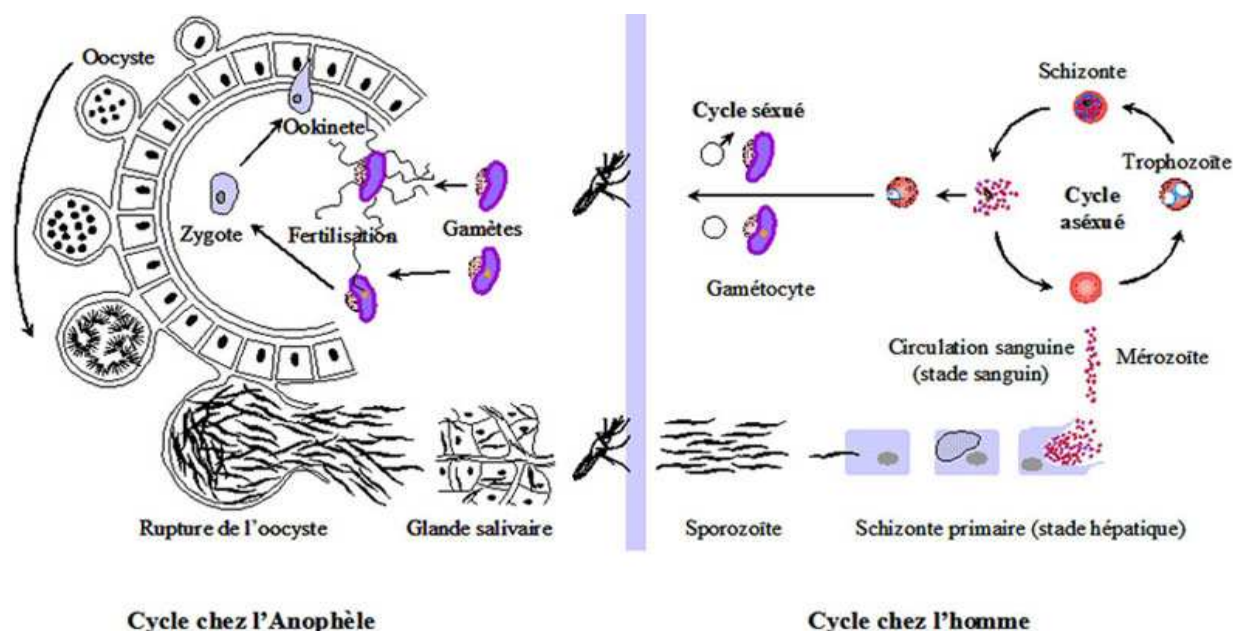


Figure 10. Cycle biologique du *Plasmodium*.
D'après www.pasteur.mg/Atelier-Palu.

Une fois injectés à l'Homme, les sporozoïtes atteignent rapidement le foie où ils pénètrent dans les hépatocytes. Certains sporozoïtes vont cependant pénétrer dans des vaisseaux lymphatiques où ils seront dégradés par le système immunitaire (Amino *et al.* 2006). Dans l'hépatocyte, le sporozoïte entreprend un processus complexe de multiplication et de développement. Rapidement, le sporozoïte se transformera en trophozoïte, entouré d'une membrane plasmique au sein d'une vacuole parasitophore qui va aboutir à la formation de mérozoïte. La cellule hépatique distendue, gonflée va éclater, déchargeant ainsi plusieurs milliers de mérozoïtes dans la circulation sanguine (deuxième forme libre du parasite). Ces mérozoïtes ne peuvent cependant pas envahir de nouveaux hépatocytes. La durée de la schizogonie exo-érythrocytaire est caractéristique d'espèce, avec une durée minimale de maturation de 5,5 jours chez *P. falciparum*. Le cycle érythrocytaire se déroule à l'intérieur du globule rouge et comporte deux phases : une phase de multiplication asexuée, la schizogonie érythrocytaire suivie d'une phase de différenciation sexuée, la gamétocytogénèse. Le mérozoïte possède des organelles d'invasion caractéristiques des *Apicomplexa* (complexe

apical, pellicule et «revêtement membranaire»), qui lui permettent de reconnaître et d'envahir l'érythrocyte. Le mérozoïte pénètre dans l'érythrocyte, il perd ses organelles et se différencie en une forme trophozoïte, arrondie, localisée dans la vacuole parasitophore à l'intérieur du cytoplasme érythrocytaire. Le jeune trophozoïte se transforme en schizonte, il va occuper tout le cytoplasme de l'érythrocyte. La durée totale de cette phase de développement intra-érythrocytaire est de 48 heures pour *P. falciparum*. Un schizonte mûr possède un nombre variable de mérozoïtes (16 à 32), qui est caractéristique de l'espèce *P. falciparum*. Les nouveaux mérozoïtes érythrocytaires ainsi formés sont libérés dans le système circulatoire sanguin à la fin de la schizogonie par l'éclatement du schizonte. Certains vont être détruits par le système immunitaire tandis que les autres vont de nouveau infecter des hématies afin de recommencer un cycle schizogonique. La gamétocytogénèse correspond à la phase pendant laquelle les parasites libres dans la circulation sanguine peuvent se différencier en gamétocytes femelles et mâles. Le moustique prélèvera ces formes circulantes infectantes au cours d'un repas sanguin. La répétition du cycle érythrocytaire entraîne une augmentation progressive de la parasitémie qui peut atteindre et dépasser le seuil pyrogène et entraîner l'apparition de manifestations cliniques de l'accès palustre. La distribution des stades érythrocytaires dans le sang n'est pas toujours homogène (White *et al.* 1992) et, dans certaines circonstances, certains stades parasites disparaissent du sang périphérique parce qu'ils sont retenus (ou «séquestrés») dans les capillaires profonds de différents tissus ou organes profonds (cerveau, cœur, 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.

1.2.2 - Les vecteurs

Les arthropodes hématophages vecteurs de pathogènes

Le vecteur est par définition un arthropode hématophage qui, à l'occasion de relations écologiques, acquiert un agent pathogène et assure, par son comportement, la transmission biologique active (ou mécanique) de l'agent pathogène d'un hôte vertébré à un autre (Rodhain F 1985). Parmi les 14600 espèces d'arthropodes hématophages effectuant plus ou moins

régulièrement des repas de sang sur des vertébrés, y compris l'homme, seulement 2 à 3 % seraient des vecteurs de maladies de l'espèce humaine ou d'animaux domestiques (Ribeiro 1995). La grande majorité des vecteurs hématophages de pathogènes d'importance médicale pour l'homme appartiennent à l'ordre des diptères. Les tiques (ordre des acariens) occupent également une place importante dans la transmission de certains pathogènes.

Les vecteurs interviennent de manière indispensable dans le cycle des pathogènes. La distribution des maladies à transmission vectorielle est ainsi restreinte à la distribution spatiale des vecteurs et des hôtes (Kitron 1998).

Mais n'importe quel parasite n'est pas transmissible par n'importe quel vecteur hématophage. En effet, la compétence vectorielle représente la sommation de plusieurs phénomènes successifs : aptitudes de l'insecte à s'infecter, à assurer le développement du pathogène et à le transmettre. Ces aptitudes sont conditionnées par des facteurs intrinsèques (propres à l'espèce) et extrinsèques (dépendants de l'environnement) tels que le comportement (préférence trophique, endo-/exo-phagie...), la susceptibilité ou la résistance au développement du parasite, ou à son environnement (présence de biotopes favorables au développement de ses populations, influence climatique...).

Pour être efficace, le vecteur doit être compétent, il doit avoir dans l'environnement une bio-écologie favorable à la transmission c'est-à-dire être abondant, avoir une grande longévité, entretenir des contacts étroits avec les vertébrés réservoirs et réceptifs, tous ces facteurs augmentant sa capacité vectorielle. La capacité vectorielle exprime à la fois le degré de coadaptation (ou compatibilité) entre parasite et vecteur et le fonctionnement du système ainsi formé dans un environnement donné (Rodhain F 1985).

Le mécanisme de transmission vectorielle comporte 3 phases :

1- L'infection du vecteur a toujours lieu au cours d'un repas sanguin sur un hôte vertébré infecté (hors transmission verticale), le vecteur est donc obligatoirement un insecte hématophage.

2- Les pathogènes se retrouvent alors au niveau du tube digestif et vont infecter certaines cellules (stomacales, macrophages...) avant de se disperser, généralement via l'hémolymphe pour migrer dans différents tissus suivant un tropisme spécifique. Le développement du parasite dans l'organisme du vecteur aura lieu uniquement si l'arthropode appartient à une espèce capable de l'assurer. L'incubation extrinsèque correspond à la période pendant laquelle les pathogènes vont évoluer biologiquement au sein du vecteur

(multiplication et/ou transformation), intervalle de temps qui sépare le repas de sang infectant du stade où le vecteur sera devenu infectant.

3- La transmission au vertébré se produit lorsque le vecteur est devenu infectant. Certains vecteurs transmettent les parasites via le fluide coxal (tiques), les fèces (réduves), par régurgitation (phlébotomes) ou par dépôt sur la peau (transmission des filaires) mais le moyen de transmission le plus commun, et celui étudié ici, se fait via la sécrétion de salive au cours d'une piqûre.

Les glossines



Figure 11. *Glossina palpalis*.

(PW Pappas et SM Wardrop: College of Biological Sciences, Ohio State University)

Classification

Les glossines ou mouches tsé-tsé sont des insectes appartenant à la famille des *Glossinidae* et au genre *Glossina*. Ce sont des mouches de couleur généralement sombre de taille moyenne (6 à 16mm) (Figure 11). Il existe 31 espèces et sous espèces de glossines classiquement réparties en 3 sous-genres ou groupes (Figure 12).

La majorité des glossines sont diurnes, elles ne sont actives que quelques instants par jour (moins d'une heure), le vol se faisant par petites périodes de quelques secondes. L'activité dépend des facteurs climatiques (température, humidité, luminosité, vent et pluviosité) et individuels (état nutritionnel, gravidité). L'activité des glossines est surtout motivée par la recherche de nourriture, d'un lieu de repos et pour les mâles par la recherche d'une femelle.

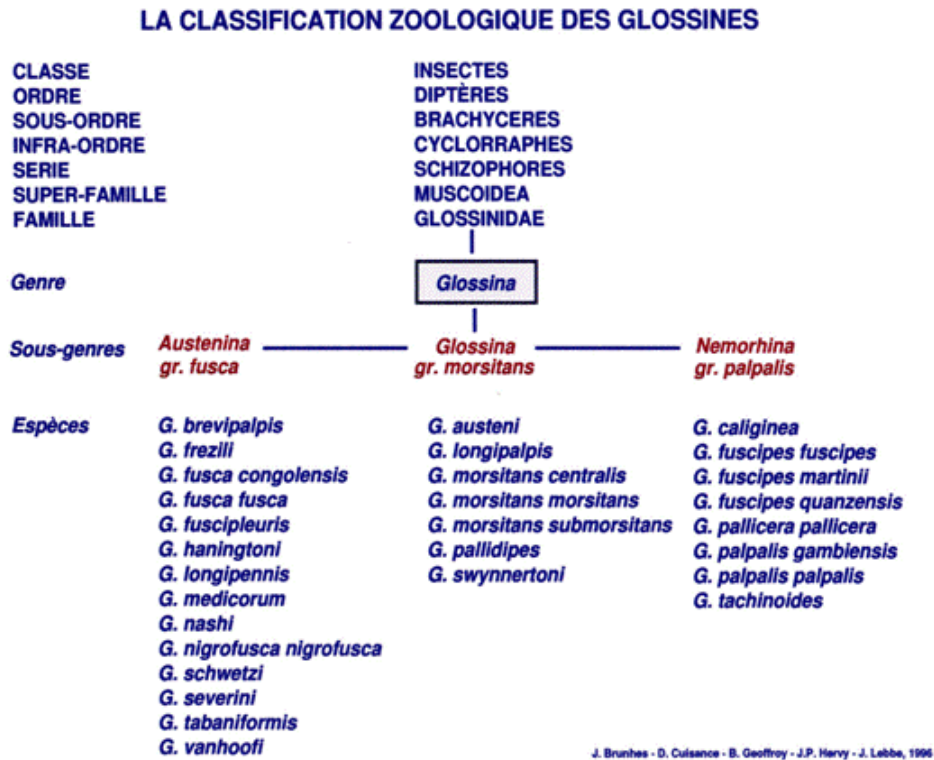


Figure 12. Classification des glossines.
D'après Brunhes et al. 1996

Cycle biologique

Les glossines sont considérées comme des diptères très évolués et caractérisés par un cycle reproductif unique en son genre. Elles appartiennent au groupe des pupipares, elles sont capables de donner naissance à une larve qui, sans se nourrir dans le milieu extérieur, aboutira à un adulte après nymphose (Figure 13). Les glossines présentent un cycle de développement long (40 à 100 jours) et un taux de reproduction très bas (au maximum 10 descendants par femelle) compensé par une grande longévité (jusqu'à 100j) (Rogers *et al.* 1985). Des records de 7 à 9 mois voir 1 an ont été enregistrés chez *G. palpalis* (Laveissiere *et al.* 2000). Cela souligne leur grande capacité vectorielle vis à vis du trypanosome.

Les femelles sont généralement fécondées dès la sortie du puparium avant même leur premier repas sanguin. Le liquide séminal et les spermatozoïdes sont stockés dans des spermathèques, un seul accouplement suffit. La femelle produit sa première larve à l'âge de 18-20 jours puis au rythme d'une larve tous les 10 jours. La larve issue de l'œuf va passer par 3 stades larvaires successifs avant d'être mature. A maturité (2 à 3 jours après le dernier repas sanguin), la larve est déposée dans un gîte de reproduction qui est le plus souvent le lieu de repos diurne de la femelle caractérisé par un couvert végétal assurant une ombre suffisante.

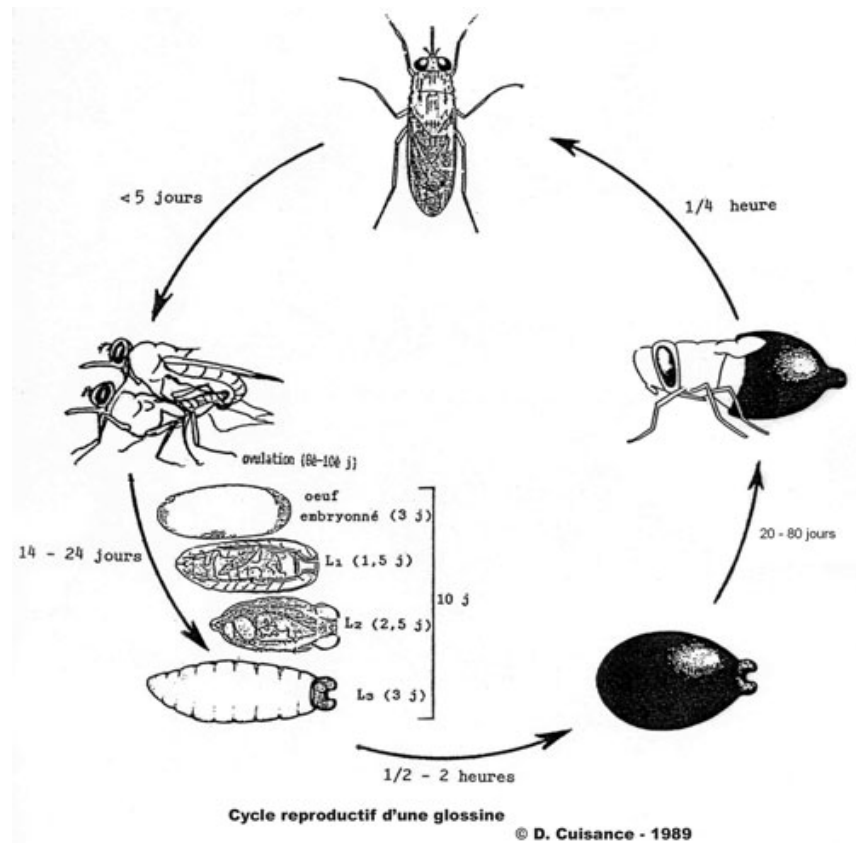


Figure 13. Cycle biologique des glossines.

Schéma du cycle de reproduction d'une glossine : accouplement, développement de l'œuf et de la larve dans l'utérus de la femelle, ponte d'une larve au stade 3, transformation en pupa et émergence d'un nouvel adulte.

D'après D. Cuisance, Cirad-emvt.

Fragile et craignant la lumière et la dessiccation, la larve doit s'enfoncer rapidement dans le sol entre 2 et 8 cm de profondeur avant de se transformer en pupa. La dernière mue larvaire a alors lieu, le tégument se rigidifie et se mélanise formant le puparium. La larve du quatrième stade va subir dans le puparium les transformations nécessaires jusqu'au stade pré-imaginal. La durée de la nymphose est variable et dépend de la température du sol. Des températures en dessous de 14°C bloquent le développement et pour pouvoir survivre, la pupa de nombreuses espèces de glossine a besoin d'un sol humide (mais non détrempé). L'immobilisme de la pupa soumet celle-ci à des risques importants environnementaux (inondations, incendies, compactage du sol). Au terme de son développement nymphal, l'adulte rompt le puparium et remonte à la surface. La glossine est à ce stade qualifiée de ténérale, elle n'a pas encore pris son premier repas sanguin. Le premier souci de l'adulte est justement de trouver un hôte pour se nourrir. C'est au cours de ce premier repas sanguin que la glossine peut devenir infectée et donc vecteur. Moins de 10% des glossines deviennent infectantes au contact d'un malade.

Comme dans chaque système de transmission vectorielle, la capacité vectorielle des insectes permet de définir des espèces vectrices ou non. Les espèces de glossines vectrices de *T. b. gambiense* sont classiquement :

Glossina palpalis et sous-espèces,
Glossina fuscipes et sous-espèces,
Glossina tachinoides,
et *Glossina caliginea*.

Plus particulièrement, les espèces étudiées dans le cadre de ces travaux de thèse sont *G. palpalis gambiense*, *G. fuscipes fuscipes* et *G. tachinoides* qui appartiennent au « groupe palpalis » ou sous-genre *Nemorhina*. Nous avons également étudié *G. morsitans morsitans* qui fait partie du « groupe morsitans » ou sous genre *Glossina* et qui est non vectrice de *T. b. gambiense*.

Répartition géographique des espèces

Les glossines sont exclusivement des insectes africains et continentaux (Figure 14). Le mode de répartition des espèces de glossine résulte principalement de l'existence de barrières climatiques (déficit en hygrométrie trop important et des températures trop élevées au nord ou trop faibles au sud) et écologiques (végétation, ainsi que la possibilité de disposer de sources de nourriture) qui limitent leur propagation sur le continent africain. Les limites des aires de distribution ne sont pas immuables du fait de la variété de ces facteurs, en effet il est très fréquent que certains s'associent pour limiter la répartition géographique de la tsé-tsé. Par exemple, au nord de l'Afrique occidentale, loin des rivières, le climat peut être très chaud et très sec selon la saison et la végétation petite et herbacée. Ce n'est qu'à proximité des rivières, où poussent arbres et broussailles, que la tsé-tsé peut survivre grâce à l'ombrage qu'ils apportent et à l'humidité qu'ils retiennent. Toutefois, là où l'on pourrait penser que la température est trop basse, il peut tout de même y avoir présence de tsé-tsé en raison de l'abondance du gibier. Le facteur nourriture est la première cause de la restriction de l'aire de distribution des tsé-tsé d'un point de vue quantitatif et qualitatif. L'absence de nourriture en quantité suffisante, fait que certains secteurs sont exempts de tsé-tsé, même s'ils leur sont favorables à d'autres égards. Par exemple la flambée de peste bovine qui a balayé l'Afrique à la fin du siècle dernier a éliminé la plupart des animaux sur lesquels se nourrissaient les glossines et il en est résulté une importante réduction des zones infectées (Laveissiere *et al.*

2000). L'absence des hôtes préférés d'une espèce empêche son installation si elle ne peut faire preuve d'opportunisme alimentaire.

Pour se protéger des rigueurs du climat chaud, les glossines se réfugient dans des zones localement plus fraîches où elles peuvent survivre, là où il y a présence d'un couvert végétal (arbres, buissons, fourrés), par exemple le long des berges fluviales que recouvrent les galeries forestières. La tsé-tsé ne séjourne presque jamais en permanence en prairie ou dans les zones de petite végétation, mais il leur arrive de les traverser. Certaines espèces peuvent marquer leur préférence pour un type particulier de végétation.

Les cartes de géo-répartition des espèces de glossines présentées dans ce chapitre sont issues du cd-rom "Les glossines ou mouches tsé-tsé" édité par l'IRD (Brunhes *et al.* 2006).

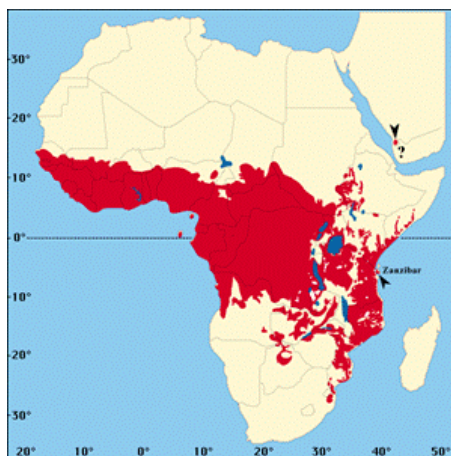


Figure 14. Aire de géo-distribution des différentes espèces de *Glossina* spp.

Les longues périodes de froid rencontrées au Sud du Mozambique, du Zimbabwe, du Botswana, de l'Angola et de la Zambie empêchent les glossines de se déplacer pour aller à la recherche de nourriture. Les glossines sont également absentes au dessus de 2000m d'altitude. Des températures élevées ajoutées à la sécheresse et à l'absence de couverture végétale, rendent le nord de l'Afrique occidentale, la plupart des régions du Soudan et certaines zones du Kenya, d'Ethiopie et de Somalie, inhospitaliers pour les glossines. En raison de leur habitat constitué de galeries forestières à proximité d'eau, les glossines du groupe palpalis, et notamment *G. palpalis* et *G. tachinoides* peuvent s'étendre en suivant les cours d'eau beaucoup plus au nord en Afrique occidentale, que les mouches du groupe morsitans.

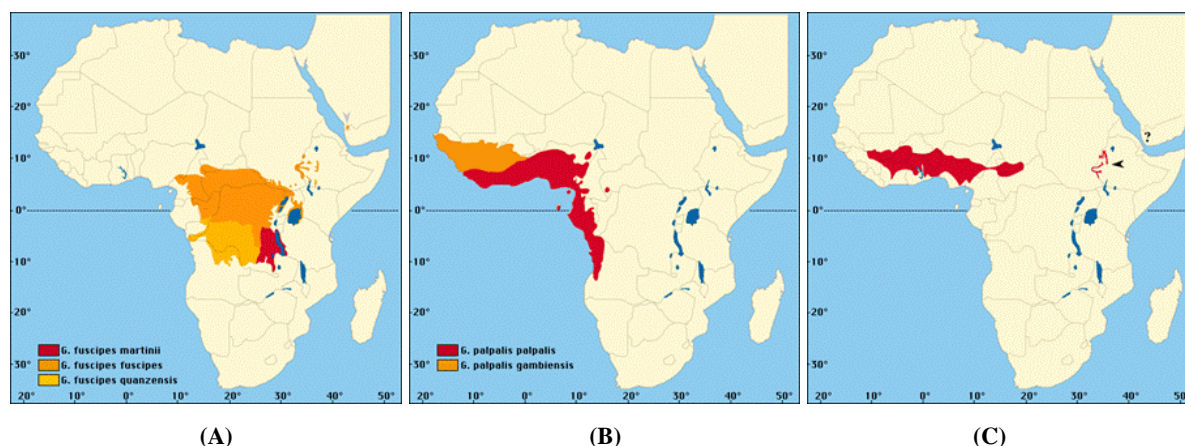


Figure 15. Aire de géo-distribution des différentes espèces de *G. fuscipes* (A), *G. palpalis* (B) et *G. tachinoides* (C).

Les espèces du sous genre *Nemorhina* étudiées ici, *G. palpalis gambiense*, *G. fuscipes fuscipes* et *G. tachinoides* sont rencontrées dans des gîtes offrant à la fois une végétation arborée relativement dense, une humidité élevée et une faune suffisamment riche en hôtes vertébrés pour assurer leur survie. Elles sont très largement répandues sur le continent africain (Figure 15): elles trouvent dans les régions forestières des conditions climatiques idéales ainsi qu'une disponibilité d'hôte et en Afrique occidentale elles bénéficient en zone de savane de l'abri des forêts riveraines bordant les cours d'eau. On retrouve les glossines au niveau des marais à palétuviers (mangrove), des forêts ombrophiles, des rives des lacs et des forêts-galeries longeant les rivières. Leur opportunisme alimentaire très marqué leur permet de modifier leur régime alimentaire. Ces espèces synanthropiques fréquentent le même espace que l'homme (plantations d'arbres fruitiers, lieu de lessive...) faisant peser une grave menace sur la santé des hommes exposés aux piqûres de ces insectes.

Les espèces du groupe *morsitans* se rencontrent dans une grande partie de la savane africaine (savane arborée, savane boisée et les forêts claires). Ces glossines se limitent aux zones suffisamment boisées pour leur assurer des lieux de repos climatiquement favorables, évitant les zones sahéliennes, trop arides et peu riches en gibier ou les zones de savanes soudanaises affectées par la sécheresse.

Il en résulte une répartition en taches discontinues (Figure 16) totalement différente de celle du sous genre *Nemorhina* mais leur localisation dans les régions d'élevage et riches en gibier les rend dangereuses partout pour l'économie pastorale mais aussi pour la santé de l'homme en Afrique orientale. *Glossina morsitans* est l'espèce la plus répandue mais sa répartition n'est pas connue avec exactitude dans tous les pays.

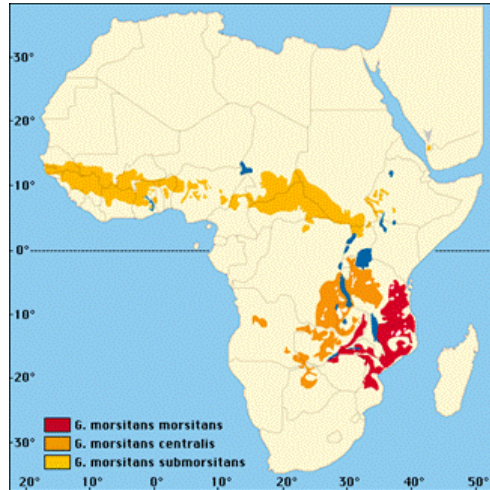


Figure 16. Aire de géo-distribution de *Glossina morsitans* spp.

Comportement trophique

Le premier repas sanguin de la glossine a lieu généralement 24 à 72 heures après l'émergence. La durée du cycle trophique dépend des conditions climatiques et de la disponibilité en hôte mais également de l'état physiologique des tsé-tsé, il est d'environ de 2 à 4 jours suivant les espèces. Les glossines mâles et femelles sont hématophages et ont une activité diurne. La glossine trouve son hôte grâce à la vue et à l'odorat. Le régime alimentaire plus ou moins strict des glossines suivant les espèces détermine le risque pour l'homme ou l'animal. Le risque est d'autant plus grand si la glossine n'est pas stricte dans son choix, elle peut alors se nourrir sur des animaux infectés et transmettent les trypanosomes à des individus sains.

Les glossines du sous-genre *Nemorhina* sont très opportunistes et éclectiques dans leur choix d'hôte selon la disponibilité locale et saisonnière. *Glossina palpalis*, *G. fuscipes* et *G. tachinoides* se nourrissent toutes trois sur l'homme; la proportion peut varier de 8% à 40 % selon les conditions locales. Elles prennent une grande partie de leur repas sur des individus utilisant des points d'eau ou franchissant des gués.

Glossina morsitans peut prendre 7 à 18 % de ses repas sur les primates (principalement l'homme). Des variations dans le choix des hôtes sont observées suivant le lieu géographique. En Côte d'Ivoire, autour des villages, *G. palpalis* prend au moins 75% de ses repas sur le porc domestique mais dans des zones de plantations, 46% des repas sont pris sur le Guib harnaché et 46% sur l'Homme. En savane, les reptiles peuvent fournir plus de 50% des repas.

Les anophèles d'Afrique



Figure 17. *Anopheles gambiae*.

<http://www.insektenmodelle.de/modelle/muecke.html>

Classification

Au niveau taxonomique, les vecteurs de 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 près de 70 peuvent transmettre les quatre espèces de plasmodies humaines. En Afrique, une douzaine d'espèces seulement est impliquée dans la transmission: celles du complexe *An. gambiae* (*An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis* principalement, figure 17) et l'espèce *An. funestus* assurent la majeure partie de la transmission en Afrique tropicale, *An. nili* et *An. moucheti* jouant aussi un rôle important dans des régions limitées. Chacune de ces espèces a des préférences pour des biotopes particuliers. Ces espèces présentent une grande capacité vectorielle, expliquant la forte endémicité palustre en Afrique.

Seule l'anophèle femelle est hématophage. Les anophèles ont une activité nocturne du coucher au lever de soleil. Certaines espèces piquent en début de nuit mais la plupart se nourrissent entre 23h et 3h. Les anophèles restent localisés près de leur lieu de naissance c'est à dire à moins de 300 m du gîte larvaire, excepté en cas de vent.

Cycle biologique

L'anophèle est un insecte holométabole, c'est à dire à métamorphose complète. Il connaît quatre stades : œuf, larve, nymphe et adulte (Figure 18). Comme toutes les espèces de moustique, le développement des anophèles est caractérisé par la succession de deux phases: une première phase aquatique qui recouvre la vie pré-imaginale (les stades œufs, larvaires et nymphaux) et une seconde phase aérienne qui concerne l'adulte, ou imago.

La durée de vie d'un anophèle adulte se situe autour d'une semaine à 10 jours pour les mâles et entre 2 à 8 semaines pour les femelles en région tropicale.

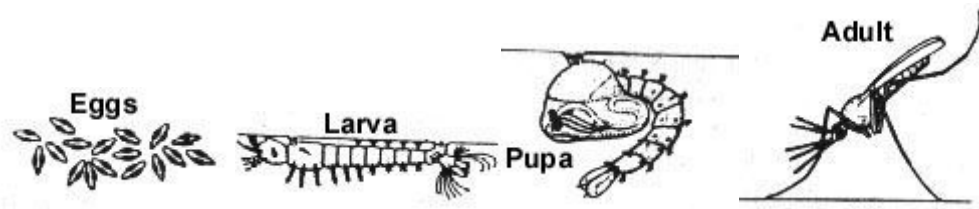


Figure 18. Cycle biologique des anophèles.

La phase aquatique : Les anophèles femelles pondent à la surface de l'eau de 40 à 100 œufs fécondés. Ces derniers, pondus isolément, sont munis de flotteurs et restent en surface durant l'embryogenèse. Entre 24 et 48 heures, chaque œuf éclot et libère une larve d'environ 1 mm qui se tient parallèle à la surface de l'eau. La larve est détritiphage et 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. Après cette métamorphose, l'imago émerge et gagne le milieu aérien. L'adulte va dans un premier temps se reposer afin que sa cuticule sèche, que ses ailes se déploient et que l'appareil génital mâle devienne fonctionnel.

Les adultes : La femelle ne s'accouple qu'une seule fois dans sa vie (Clements 1992) et 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. Les spermatozoïdes migrent dans une spermathèque dans laquelle ils conservent leur pouvoir fécondant pendant plusieurs semaines, jusqu'à la mort de la femelle. Elle prend son premier repas sanguin juste après la copulation. Le contenu protéique des repas sanguin permet la maturation des ovocytes. On distingue les femelles suivant l'état de leur abdomen pendant la digestion de sang jusqu'à maturation des ovocytes: non gorgée, gorgée, semi-gravide et gravide. Lorsque l'ovocyte est arrivé à maturité, il est fécondé par les spermatozoïdes stockés, devient un œuf qui sera pondu. Suivant les espèces, ce cycle gonotrophique peut durer entre 48 et 72 heures dans les zones tropicales et plus d'une semaine dans les pays tempérés. La connaissance du cycle gonotrophique permet d'évaluer l'âge de la femelle anophèle par son nombre de ponte ainsi que sa probabilité d'être infectante; ceci permet d'évaluer la capacité vectorielle de l'anophèle.

Remarque : Lorsque la température est trop basse, certaines espèces ne se nourrissent pas et entrent en diapause. D'autres espèces peuvent prendre des repas de sang n'induisant pas d'évolution ovarienne mais permettant l'infestation. Les œufs, quant à eux, n'éclosent pas avant la reprise des pluies.

Répartition géographique en Afrique

Chaque espèce d'anophèle occupe une aire géographique particulière. Chaque espèce colonise certains types de gîtes larvaires qui fonctionnent pendant une période donnée sous l'influence des données environnementales et climatiques spécifiques. Les différentes espèces d'*Anopheles* exploitent une grande variété de collections d'eau, de l'eau courante rapide ou lente des rizières. On ne les retrouve pas à une altitude supérieure à 2000 m d'altitude. Leur distribution géographique présente des similitudes avec la répartition des échantillons de pluie annuelle à travers l'Afrique (Coetzee *et al.* 2000).

En Afrique, où surviennent 90% des cas de paludisme, les espèces d'*Anopheles* responsables de la transmission du parasite à l'homme appartiennent au complexe *An. gambiae* dont *An. gambiae* s.s. (sensu stricto) et *An. arabiensis* sont les plus importantes en terme de distribution géographique et de capacité vectorielle. *An. gambiae* s.s., se retrouve dans les régions humides, et *An. arabiensis* est détecté dans les savanes sèches. *An. funestus*, dont le rôle dans l'épidémiologie du paludisme semble avoir été sous-évalué jusqu'ici, est retrouvé au niveau des savanes mais cette espèce nécessite des collections d'eau permanentes et ombragées.

Les cartes de répartition géographique des espèces d'*Anopheles* présentées dans ce chapitre sont issues du cd-rom " Les anophèles de la région afro-tropicale " édité par l'IRD (Hervy *et al.* 1998).

Le complexe *Anopheles gambiae*

Le complexe *An. gambiae* comprend 7 espèces (*An. gambiae* s.s., *An. arabiensis*, *An. quadriannulatus*, *An. quadrimaculatus*, *An. bwambae*, *An. melas* et *An. merus*). Les cinq premières espèces sont des espèces d'eau douce alors qu'*An. melas* et *An. merus* sont des espèces d'eau saumâtre (Mouchet *et al.* 2004).

Ce complexe assure 80% de la transmission palustre en Afrique sub-saharienne. *An. gambiae s.s.* est l'un des meilleurs vecteurs du paludisme du monde et aucune des espèces de ce complexe ne serait réfractaire aux plasmodiums (Coosemans *et al.* 1998).

Les zones de recouvrement entre *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* s'étendent sur presque toutes les zones de savane d'Afrique de l'ouest, de l'est et du cône Sud (Figure 19). *An. gambiae s.s.* se retrouve dans les régions humides. On retrouve chez cette espèce des indices sporozoïtiques (Is) en général supérieur à 3% atteignant même 10%. *An. gambiae ss.* occupe la plus grande partie de la région afrotropicale à l'exclusion de la Corne de l'Afrique et de la péninsule Arabique. *An arabiensis* est distribué dans toutes les zones de savane et de steppe de la région Afrotropicale, il est bien adapté aux climats secs dans le nord du sahel. Considéré comme bon vecteur bien que sa compétence vectorielle soit intrinsèquement inférieure de moitié à celle de *gambiae s.s.* (Lemasson *et al.* 1997). Son Is peut être supérieur à 1% (dans le sahel sénégalais) mais peut être beaucoup plus bas.

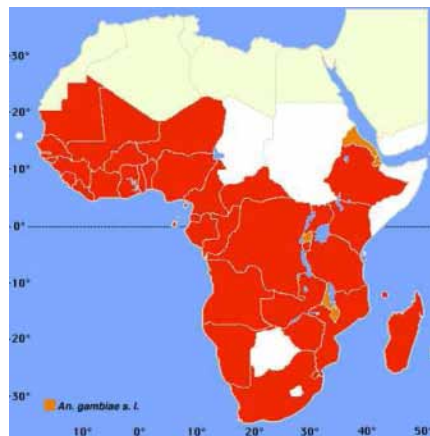


Figure 19. Géo-distribution des vecteurs *Anopheles gambiae s.l.*

Pour les espèces d'eau douce, les gîtes larvaires sont constitués généralement de collections d'eau temporaires peu profondes et ensoleillées sans végétation: flaques résiduelles des cours d'eau en décrue, marécage, rizières, petite mare (Figure 20). On retrouve aussi des gîtes anthropiques tels que les surfaces irriguées, les barrages et les fosses.



Figure 20. Gîtes potentiels d'*An. gambiae s.l.*

Les gîtes des espèces d'eau saumâtre peuvent être des eaux résiduelles des grandes marées, ensoleillées.

Le groupe *An. funestus*

Ce groupe comporte huit espèces (*An. funestus* s.s., *An. aruni*, *An. parensis*, *An. vaneedeni*, *An. brucei*, *An. confusus*, *An. fuscivenosus*, *An. rivulorum*), et assure une part importante de la transmission du paludisme en Afrique. Seul *An. funestus* s.s. est anthropophile et possède une grande capacité vectorielle. Des Is supérieurs à 1% ont été relevés dans l'ensemble de son aire de répartition. (Dia *et al.* 2008). Sa distribution géographique couvre toute la région Afrotropicale (Figure 21).

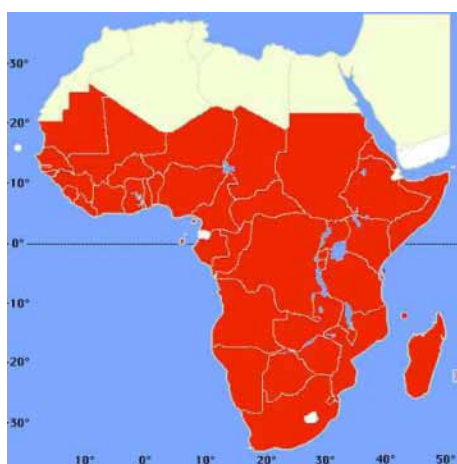


Figure 21. Géo-distribution des vecteurs *Anopheles funestus*.

An. funestus 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. Très endophile, cette espèce a été victime des aspersions intra domiciliaire.

Comportement trophique

L'étude du comportement trophique des anophèles vecteurs est indispensable pour définir les stratégies de lutte. Les anophèles piquent à partir du coucher du soleil jusqu'au petit matin. Mâles et femelles se nourrissent de jus sucrés, 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 1992), elle prélève un repas de sang tous les 2 à 3 jours sur un hôte vertébré, elle peut prélever jusqu'à 4 fois son volume

de sang. Il a été observé que *An. gambiae* s.s. pouvait se nourrir sur au moins sur 2 personnes successivement (Boreham 1975). 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). Le parasite semble influencer le comportement du vecteur, par ce biais, le temps du repas, celui de la salivation et le nombre de piqûres sont en effet augmentés chez un vecteur infecté ce qui faciliterait la dissémination du pathogène à plusieurs hôtes (Rossignol *et al.* 1984; Wekesa *et al.* 1992).

Le régime alimentaire des *Anopheles* dépend des espèces, certaines sont strictement anthropophiles (*An. gambiae* s.s. dans la forêt camerounaise (Mouchet *et al.* 2004)) ou zoophiles (*An. rufipes*) mais la plupart des espèces se nourrissent indifféremment sur l'homme ou les animaux. Les préférences trophiques d'*An. gambiae* varient suivant l'environnement et la disponibilité en hôte, il se montre particulièrement zoophile lorsque le bétail abonde. *An. gambiae* s.s. est très anthropophile. *An. Arabiensis* est considéré moins anthropophile qu'*An. gambiae* s.s., mais au Sénégal il s'attaquerait à l'homme aussi bien qu'au bétail dans des conditions identiques d'accès aux hôtes (Diatta *et al.* 1998), il y a donc des différences de comportements suivant les régions et l'environnement. Le comportement endophilie-exophilie est variable selon la saison, selon les préférences trophiques, les types d'habitat, etc...

La majorité des espèces du groupe *funestus* sont zoophiles, seule l'espèce *An. funestus* s.s. est anthropophile et impliquée dans la transmission des plasmodiums grâce à une capacité vectorielle élevée.

Les hommes et les animaux vivent très souvent sur les mêmes aires d'habitations et entretiennent des contacts fréquents. Les moustiques vecteurs du paludisme se nourrissant aussi bien sur l'homme que sur l'animal, la question s'est posée de savoir si les animaux domestiques pouvaient avoir un rôle bénéfique de bouclier ou de leurre vis-à-vis de la transmission du paludisme (zooprophylaxie) ou bien au contraire un rôle néfaste en attirant les vecteurs près des habitations (zoonuisance).

Depuis 1982, l'OMS admet que les animaux jouent un rôle zooprophylactique et a édité plusieurs recommandations. Pourtant, différentes études ont montré des résultats contradictoires. En effet, des études au Pakistan (Bouma *et al.* 1995) et en Ethiopie (Seyoum *et al.* 2002) ont montré respectivement que la présence de bovins augmentait de 38% le risque pour l'homme d'être piqué par un anophèle et que le nombre de piqûres d'*An. arabiensis* chez

les enfants de moins de 10 ans augmente avec la présence d'animaux dans les concessions. A l'inverse, deux études kenyanes ont montré que la proportion de repas sanguins d'origine humaine était très faible dans les zones où les hommes et les animaux cohabitaient (Githeko *et al.* 1994; Ijumba *et al.* 1990). Cette zooprophylaxie pourrait trouver aussi une explication indirecte puisque l'utilisation d'insecticides et d'antiparasitaires sur le bétail modifierait la population anophélienne des concessions traitées et diminuerait ainsi la prévalence de paludisme humain à *P. falciparum* et *P. vivax* (McCall *et al.* 2001; Ulloa *et al.* 2002). Enfin, certains auteurs concluent sur un rôle neutre des animaux domestiques au vue par exemple de l'étude de Bogh en Gambie qui ne mettait pas en évidence de différence significative dans la prévalence du paludisme chez les enfants dormant à moins de 20m des animaux et ceux vivant à plus de 50m (Bogh *et al.* 2002).

Le rôle des animaux dans la transmission du paludisme semble donc être complexe. En effet, il est difficile de comparer des zones où *An. arabiensis*, plutôt zoophile, est le vecteur principal, à d'autres où c'est *An. gambiae s.s.*, très anthropophile, qui prédomine.

Deux études récentes intégrées au projet Zooprovect de l'IRD-UR024 ont démontré, au Sénégal, que le rôle des animaux variait en fonction de l'espèce et de leur âge. En effet, la présence de jeunes animaux, toutes espèces confondues, serait associée avec une baisse significative de l'incidence du paludisme chez les enfants, jouant donc un rôle zooprophylactique (particulièrement les jeunes bovins). La présence de chiens serait, elle, associée à une augmentation significative du nombre de cas de paludisme chez les enfants de 11 mois à 6 ans et représenterait donc une zoonuisance. (Denis Boulanger, communication personnelle).

Chapitre 2

*La lutte contre les maladies à
transmission vectorielle et ses limites.*

La lutte contre les maladies à transmission vectorielle nécessite une approche intégrée dirigée à la fois contre les pathogènes et contre les vecteurs. Aujourd'hui deux méthodes complémentaires de lutte sont développées :

1 - la réduction de la charge parasitaire à travers le dépistage et/ou le diagnostic afin de mettre en place un traitement adapté chez les personnes infectées.

2 - la réduction des populations de vecteur et du contact homme-vecteur à travers la lutte anti-vectorielle.

2.1 - La réduction de la charge parasitaire

La diminution de la charge infectieuse se fait à travers le dépistage et le traitement des porteurs de parasites. Dans le cadre des deux pathologies étudiées ici, la réduction des densités parasitaires chez les vertébrés a deux objectifs principaux :

❖ Réduction de la mortalité et prévention des séquelles neurologiques = lutte individuelle

Les malades ayant souffert d'accès palustre sévère ou d'atteintes neurologiques au cours de la THA peuvent souffrir de séquelles neurologiques irréversibles s'ils sont traités trop tardivement. Par ailleurs, ces maladies sont létales sans l'instauration d'un traitement. Il est donc nécessaire d'établir au plus vite le diagnostic qui doit être suffisamment sensible et spécifique afin de détecter les personnes infectées et de les traiter avec des molécules efficaces et ayant fait preuve d'innocuité. Cette prise en charge permettra de réduire la morbidité et la mortalité de ces maladies.

❖ Prévention de la transmission des pathogènes aux autres personnes = lutte communautaire

La proportion de moustiques infestés dans une localité est en rapport avec le nombre de personnes infestées et infectantes vivant à cet endroit. Par conséquent, en abaissant les charges parasitaires, on abaissera la transmission et on réduira en fin de compte la prévalence et l'incidence de ces maladies dans cette localité.

2.1.1 - Trypanosomiase Humaine Africaine

La THA est l'une des rares maladies infectieuses où le dépistage actif systématique est essentiel dans la lutte contre la maladie, et spécialement contre la forme à *T.b. gambiense* dont

la phase initiale asymptomatique est très longue dans le temps. Les individus infectés ne ressentent pas la maladie donc ne vont pas consulter au centre de santé ; ils constituent d'excellents réservoirs de parasites permettant une transmission. La méthode de lutte consiste à mettre sur pieds des équipes médicales mobiles qui auront pour mission d'aller, dans les villages des zones endémiques, examiner périodiquement tous les individus afin de déceler chez eux les premiers signes de l'infection et de les mettre aussitôt sous traitement adapté dans leur intérêt et celui de la communauté. Mais les prospections se heurtent à l'inaccessibilité des individus qui sont souvent dispersés dans de vastes zones géographiques.

Dépistage et diagnostic

La démarche diagnostic se base sur une suspicion clinique, suivie de la mise en évidence du parasite dans les liquides biologiques de l'homme ((Jamonneau *et al.* 2004), figure 22). Le principal signe clinique de la première phase de la maladie est la présence d'adénopathies cervicales ou sus-claviculaires. Une palpation de la région cervicale postérieure est effectuée chez tous les individus. Un dépistage sérologique indirect peut également être entrepris avec le CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis). Ce test permet de mettre en évidence la présence d'anticorps (Ac) spécifiques aux trypanosomes, il est devenu le test de terrain le plus utilisé (Magnus *et al.* 1978). Il peut être réalisé sans électricité et nécessite peu de moyens, il est peu cher (Noireau *et al.* 1988). La sensibilité du test varie de 75 à 100%. Il existe des zones où la sensibilité du test est faible notamment au Nigeria ou dans le sud Cameroun. Les anticorps spécifiques de trypanosomes mis en évidence par ce test peuvent encore être détectables 3 ans après le traitement (Garcia *et al.* 2000). Cette technique a depuis été modifiée et deux nouvelles versions sont actuellement disponibles, le microCATT, qui se pratique sur un éluat de sang séché sur papier filtre (Miezan *et al.* 1991) et le LATEX/T.b.gambiense® qui augmente la sensibilité et permet un meilleur diagnostic sérologique (Buscher *et al.* 1999). Des variants de ce test sont actuellement à l'étude notamment un test au latex comportant plusieurs antigènes (Jamonneau *et al.* 2000). La méthode du dépistage par sérologie possède deux avantages sur celle par la recherche de ganglion, il permet un diagnostic très précoce, avant que les parasites ne soient visibles facilement dans le sang et que l'hypertrophie ganglionnaire ne se manifeste, le diagnostic est donc plus sensible. Mais il est uniquement suggestif d'une infection (manque de spécificité et de sensibilité) et tout CATT positif doit être confirmé par des tests parasitologiques directs mettant en évidence directement la présence des parasites dans les différents liquides de l'organisme (sang, lymphes, Liquide Céphalo-Rachidien (LCR)).

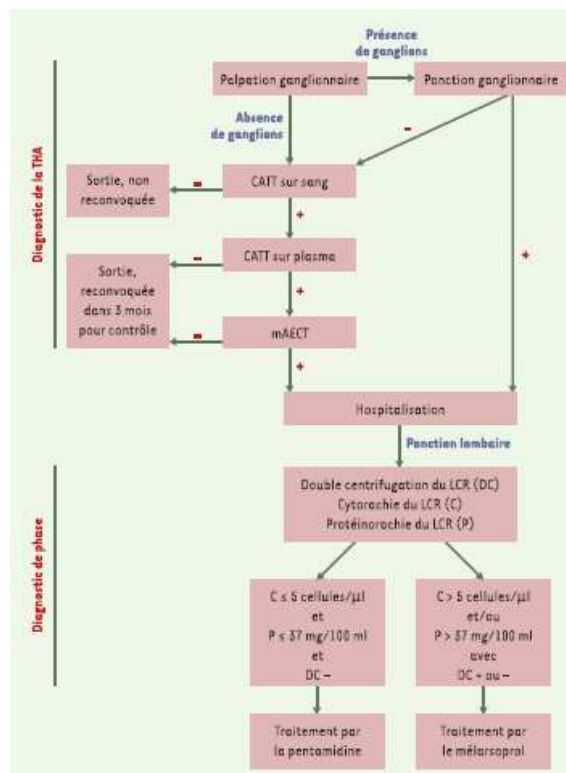


Figure 22. Dépistage et diagnostic de phase de la THA.
D'après (Jamonneau *et al.* 2004).

La plupart des patients parasités par *T. b. gambiense* présentent une parasitémie faible, et la mise en évidence des parasites est difficile. Les méthodes de concentration des parasites deviennent donc nécessaires. Pour ces tests directs, les techniques de concentration (centrifugation ou filtration sur cellulose) des parasites ont permis d'obtenir de meilleurs résultats que l'examen direct du sang frais (Lumsden *et al.* 1979). Des défauts de sensibilité et de spécificité ont aussi été rapportés pour les méthodes sérologiques directes ou indirectes (Diallo *et al.* 1996; Dukes *et al.* 1992). Le développement de la détection de l'ADN trypanosomien par des techniques de PCR semble une alternative aux tests diagnostics actuels mais des améliorations sont néanmoins nécessaires. Cet outil de biologie moléculaire est plus sensible que les techniques classiques (Truc *et al.* 1999) et permettrait de détecter les infections précoces (Bengaly *et al.* 2001). Mais des problèmes de reproductibilité ont été rapportés (Solano *et al.* 2002).

Chez les personnes confirmées porteur de trypanosomes, il faut ensuite déterminer en quelle phase de la maladie (phase lymphatico-sanguine ou phase hémato-méningée) elles se trouvent afin de leur administrer un traitement adapté. Le diagnostic de phase repose sur la mise en

évidence de trypanosomes au niveau du LCR (méthode directe), cela nécessite de pratiquer une ponction lombaire, acte très invasif. Des arguments biologiques mettant en évidence une altération du LCR (élévation de la protéinorachie (>450 mg/L) et de la cytorachie (> 5 éléments/ μ L)) peuvent également permettre de déclarer un individu en deuxième phase surtout si les signes cliniques sont évocateurs de troubles neurologiques.

Traitement

La THA est une maladie mortelle sans traitement et un nombre limité de molécules est disponible. Deux traitements sont possibles en fonction de la phase de la maladie : le traitement de la première phase comporte la pentamidine (Pentacarinat®) ou la suramine (Germanin®) et le traitement de la deuxième phase est basé sur le méléarsoprol (Arsobal®) ou l'alpha-difluorométhylornithine (DFMO, éflornithine, Ornidyl®). La pentamidine reste le traitement classique de la première phase, le traitement est très efficace et sans grand effet secondaire contrairement au traitement de la deuxième phase qui présente une toxicité non négligeable. Le méléarsoprol est un dérivé arsenical utilisé classiquement auquel on associe généralement une corticothérapie. La mise sous traitement spécifique de la deuxième phase nécessite une surveillance particulière afin d'éviter toute complication, il a généralement lieu au niveau de structures spécialisées avec du personnel compétent. Cette molécule est responsable de 5 à 10% d'encéphalopathie mortelle. L'éflornithine montre de bons résultats mais son coût élevé réserve cette molécule comme traitement de deuxième phase en cas de rechute.

L'augmentation de la pharmaco-résistance aux médicaments actuels utilisés depuis 1940 devient un problème alarmant en raison du manque d'alternative thérapeutique. Dans certaines parties d'Afrique centrale, le taux de pharmacorésistance au méléarsoprol atteint 30% (Barrett *et al.* 1999; Matovu *et al.* 2003).

La présence d'un réservoir animal domestique ou sauvage ne laisse pas penser qu'un assainissement du réservoir humain permettrait d'interrompre la transmission à 100%. Il serait donc nécessaire de développer des stratégies visant à diminuer la parasitémie au niveau du réservoir animal.

2.1.2 - Paludisme

Diagnostic

La technique traditionnelle du diagnostic du paludisme repose sur la mise en évidence directe du parasite dans le sang. Les techniques de référence sont le frottis sanguin et la goutte épaisse. L'obtention d'un diagnostic de certitude par cette technique de référence nécessite la présence d'un technicien de laboratoire qualifié. La technique de la goutte épaisse est 20 à 30 fois plus sensible que celle du frottis. Ces deux techniques permettent également le dénombrement des plasmodies et d'identifier l'espèce infectante. Elles permettent d'évaluer les paramètres tels que prévalence, densité parasitaire, et l'indice gamétocytaire. Par ailleurs, la définition de l'accès palustre reste très subjective en l'absence quasi générale de microscope dans de nombreuses régions. Dans des conditions de terrain, 50 % des accès palustres présomptifs résultent d'un diagnostic erroné ou insuffisant (Baudon *et al.* 1985).

Il existe également des techniques de diagnostic indirect (sérologie, recherche d'antigènes ou détection d'acides nucléiques parasitaires). Les tests de diagnostic rapide (TDR) sont réalisés à partir de bandelette chromatographique. Ils consistent en la détection de différents antigènes plasmodiaux par l'utilisation de bandelettes auto-réactives contenant des anticorps monoclonaux spécifiques de ces antigènes. Leur seuil de détection est comparable à celui de la goutte épaisse. Cependant avec cette méthode, le diagnostic d'espèce n'est pas toujours possible et la numération des hématies parasitées n'est pas réalisable. De plus, le coût de ces tests sur bandelette reste encore trop élevé (environ 1\$US). Des techniques basées sur la PCR sont également en cours de développement.

Le diagnostic clinique a une très faible spécificité, les signes et les symptômes de l'accès palustre tels que la fièvre, frissons, céphalées et anorexie ne sont pas spécifiques et sont communs à de nombreuses affections (Rogier *et al.* 2001). La pertinence de critères de diagnostic clinique varie d'une région à l'autre en fonction de l'intensité de la transmission et des autres causes communes de fièvre (WHO 2000). La présence de co-infections et notamment VIH peut être à l'origine d'une modification de l'épidémiologie clinique du paludisme (Nwanyanwu *et al.* 1997).

Le traitement par anti-paludique des personnes présentant des signes et des symptômes évocateurs de paludisme reste l'approche la plus raisonnable dans la plupart des situations

(Barat *et al.* 1999). De nombreuses études ont rapporté que 25-40% de patients, aux dispensaires ou dans des hôpitaux dans des régions endémiques en Afrique, étaient diagnostiqués malades du paludisme sans confirmation parasitologique au laboratoire (Bremar *et al.* 2007). Pourtant l'introduction des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA ou ACT en terminologie anglo-saxonne) a mis en avant la nécessité qu'il y a à améliorer la spécificité du diagnostic palustre car le coût relativement élevé de ces médicaments ne permet pas de traitement inutile.

Traitement

L'émergence, la diffusion et l'augmentation de la résistance accrue de *P. falciparum* aux antipaludiques est certainement une des causes majeures de l'augmentation des décès par paludisme (Trape 2001). La chloroquine est restée longtemps le traitement de première ligne des accès palustres mais elle est désormais inefficace dans la plupart des zones d'endémie et la résistance à la sulfadoxine/pyriméthamine et à l'amodiaquine augmente rapidement (Ursing *et al.* 2007)(Fernandes *et al.* 2007) (Figure 23).

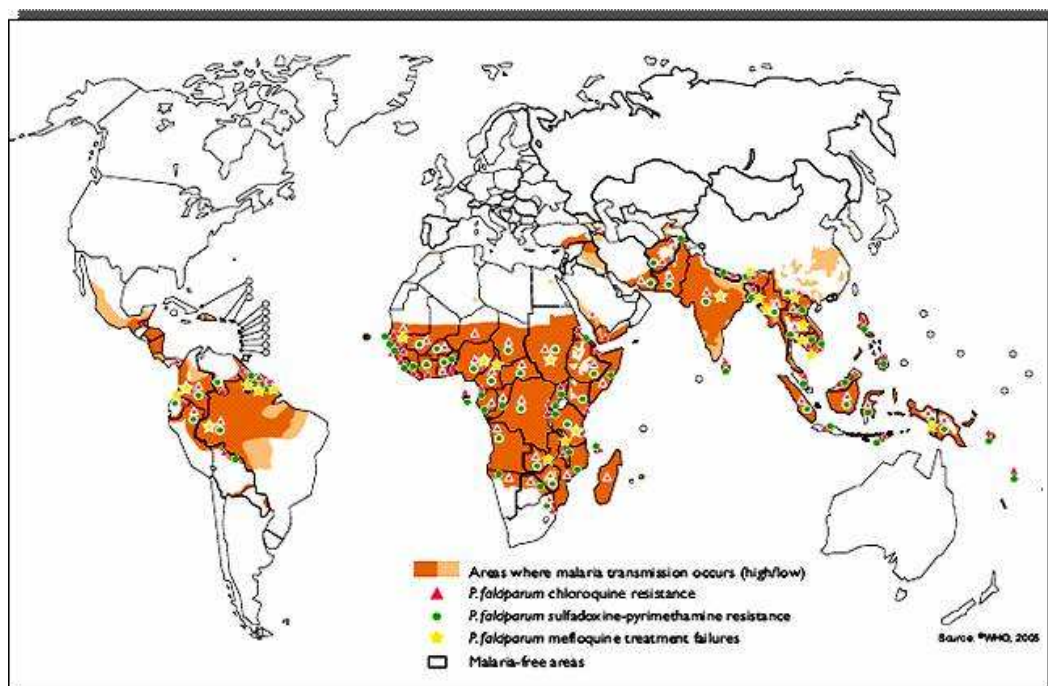


Figure 23. Distribution mondiale des échecs thérapeutiques à la chloroquine, sulfadoxine-pyriméthamine (SP) et méfloquine.
D'après WHO.

Cependant, des études effectuées au Malawi, ont montré que les souches de *P. falciparum* immuno-résistantes à la chloroquine, peuvent redevenir sensibles à cette molécule après un arrêt d'utilisation pendant plusieurs années (Kublin *et al.* 2003).

La découverte et la mise au point des dérivés de l'artémisinine ont fourni une nouvelle classe d'antipaludiques très efficaces (Haynes 2001). Pour faire face au risque d'une résistance de *P. falciparum* aux monothérapies et pour améliorer l'issue du traitement, les combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine sont désormais recommandées par l'OMS pour le traitement des cas de paludisme simple à *P. falciparum* (Imbert *et al.* 2002). Ces médicaments présentent également l'avantage de réduire le portage des gamétocytes et donc de diminuer la transmission du paludisme, ce qui contribue à la lutte antipaludique dans les zones de faible endémicité.

Deux classes de médicament sont actuellement disponibles pour le traitement parentéral du paludisme grave : les alcaloïdes du quinquina (quinine et quinidine) et les dérivés de l'artémisinine (artésunate, artéméther, etc.).

La réduction des charges parasitaires passe également par les stratégies préventives. Celles-ci seront développées dans un prochain chapitre "2.3 - Stratégies préventives de transmission".

2.2 - La réduction des populations de vecteurs et du contact homme-vecteur par la lutte anti-vecteur

Désormais, la lutte contre les insectes vecteurs, s'oriente vers des méthodes visant, non plus à éradiquer les populations d'insectes nuisibles, mais à réduire et à contrôler leur densité en dessous d'un seuil épidémiologiquement tolérable permettant de limiter la transmission. Ce changement de politique repose sur les méthodes de lutte anti-vectorielle (LAV) intégrées comprenant l'éducation sanitaire des populations humaines et l'aménagement de l'environnement, mais aussi l'utilisation raisonnée d'insecticides chimiques ou d'origine biologique. La réduction du contact homme-vecteur consiste en la mise en place de barrières mécaniques (moustiquaires) ou de modification du comportement humain. La mise en place de la LAV requiert une bonne connaissance des vecteurs afin d'optimiser les méthodes de lutte en connaissance de leur biologie (conditions de développement, lieu, période, dynamique...) et de leur écologie. La première étape de la LAV consiste souvent à identifier des vecteurs présents dans la zone, pour cela des études d'échantillonnage entomologique sont effectuées.

2.2.1 - Lutte contre les populations de glossines

Dans le cadre de la lutte contre les glossines, du fait de leur répartition focale, il est impératif de connaître les limites des foyers afin de délimiter la zone d'intervention. Ces aires sont déterminées au regard de la restriction des gîtes et des zones où le contact homme-glossine peut avoir lieu. Les techniques doivent être choisies en fonction de la bio-écologie du foyer et des ressources disponibles. Dans le passé la destruction des gîtes de reproduction et de repos des glossines par utilisation d'insecticides, l'élimination de la faune sauvage ainsi que le défrichage ont été des stratégies largement utilisées (Laveissiere *et al.* 2000). Deux familles d'insecticides ont particulièrement été utilisées: les organochlorés (DDT et Dieldrine) et les pyréthrinoïdes de synthèse (Deltaméthrine). Mais leur impact négatif sur l'environnement a restreint leur utilisation à certains contextes particuliers. Par ailleurs, les insecticides sont particulièrement difficiles à répandre dans les forêts galeries peu accessibles. Des captures manuelles à l'aide de filet ont également été pratiquées au niveau des gîtes de repos ou nocturne.

De nos jours, la capture des glossines par des pièges et des écrans est couramment utilisée (Brightwell *et al.* 1991). Les modèles ont été élaborés à la suite de la compréhension du comportement des glossines. Le concept de ces méthodes de piégeage consiste à combiner un attractif avec un toxique, il constitue un leurre attractif visuellement imprégné d'insecticide et son attractivité dépend presque exclusivement du choix des tissus. La glossine est attirée par la couleur bleue et par le contraste entre le piège/écran et l'environnement. Certains systèmes sont dotés d'attractants visuel et/ou olfactif.

L'écran est une surface plane en tissu imprégné d'insecticide sur laquelle doit se poser la glossine. L'utilisation d'un pesticide est obligatoire. Il doit être attractif de loin et inciter la glossine à se poser pour qu'elle puisse prendre une dose mortelle d'insecticide. l'écran est moins efficace que les pièges mais il présente des avantages : maniabilité, robustesse, ré-imprégnation par simple immersion et il est peu cher (Figure 24).



Figure 24. L'écran bleu/noir/bleu.
(<http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biologie/photossq/photos/>.)

Les pièges sont des volumes à l'intérieur desquels la glossine doit pénétrer. A proximité la glossine est attirée par le contraste entre le tissu bleu et les ouvertures sombres (Lancien *et al.* 1987). Elle y est tuée soit par exposition prolongée au soleil, soit par contact avec un insecticide déposé sur le tissu qui le compose. Il existe une version améliorée de ces pièges : le piège biconique (Figure 25), basé sur le même principe et destiné à améliorer le rendement, faciliter sa construction mais aussi diminuer le prix de revient (Laveissiere *et al.* 1990).



Figure 25. Piège biconique proche d'un point d'eau.

Il se développe également des méthodes de contrôle des populations de glossines par le lâcher de mâles stériles (Vreysen *et al.* 2000). Elle consiste à introduire dans une population sauvage un certain nombre de mâles stérilisés physiquement ou chimiquement de la même espèce qui, par compétition, vont s'accoupler avec les femelles. La réussite repose sur le fait que les glossines femelles ne s'accouplent qu'une fois. Il est recommandé d'utiliser au préalable une technique complémentaire autre afin de diminuer dans un même temps la

population glossienne et donc de permettre aux mâles stériles d'être compétitifs. Néanmoins cette technique rencontre des problèmes, en plus d'un coût élevé, l'utilisation des mâles peut être source de nuisance. Par ailleurs, l'élevage de masse de l'espèce est difficile.

La lutte biologique au niveau des pupes n'a pas montré de résultats concluants.

L'efficacité de la lutte anti-vectorielle est souvent limitée par des problèmes de logistique, l'apparition de résistance aux insecticides utilisés et par un coût élevé des campagnes anti-vectorielles. La capacité de dispersion des glossines se pose également comme un obstacle à la réussite de la LAV.

2.2.2 - Lutte contre les populations d'anophèles

La lutte anti-vectorielle constitue un élément technique fondamental de la stratégie mondiale de lutte contre le paludisme. En ce sens, elle s'avère être le moyen le plus efficace pour prévenir la transmission. Cette forme de lutte peut s'exercer à des stades différents du cycle du moustique. En général, deux stades sont ciblés : le stade larvaire et le stade adulte.

Lutte anti-larvaire

La lutte anti-larvaire a été très utilisée avant l'arrivée massive des adulticides. Cette lutte empêche le développement des larves en stade mature par la destruction des gîtes larvaires ou par l'emploi de méthodes aboutissant au blocage du développement des larves. Diverses techniques sont employées allant des plus rudimentaires aux plus sophistiquées : assainissement de l'environnement, recours à des prédateurs larvicides (Fillinger *et al.* 2003). Ces diverses méthodes sont toujours utilisées (WHO 2006). L'application de ces techniques sur des surfaces étendues a donné des résultats très encourageants (éradication des populations d'*Anopheles* au Brésil et en Egypte). Néanmoins, pour être efficace cette méthode exige un suivi sur plusieurs années et une bonne implication des populations locales concernées (WHO 2006). Elle n'est plus recommandée que dans des cas bien particuliers (oasis des déserts, paludisme urbain). Elle ne peut être utilisée que si les gîtes sont facilement accessibles et en nombre limité, ce qui est particulièrement difficile avec les vecteurs du paludisme.

Lutte anti adulte

Les objectifs de cette lutte sont la réduction des densités de moustiques agressifs et la réduction de la longévité des femelles.

La lutte anti-adulte se fait généralement par l'utilisation d'insecticides à effet rémanent lors des programmes d'aspersions intra-domiciliaires, ou d'imprégnation de moustiquaires, mais aussi par les pulvérisations aériennes ou l'utilisation de répulsifs. Les aspersion intra-domiciliaires et les moustiquaires imprégnées sont des mesures de lutte contre les moustiques adultes applicables à de plus vastes zones géographiques que celles plus spécifiques et plus localisées de la lutte anti-larvaire.

Des insecticides appartenant à 3 grands groupes de composés chimiques (Organochlorés, organophosphorés et carbamates) ont été utilisés pour les pulvérisations intra-domiciliaires, mais ils ont tous montré beaucoup de limites dans leur utilisation (toxicité et bio-accumulation). Le DDT est le plus connu des insecticides et a été le premier à être utilisé durant les années 1950. Il a fortement contribué à l'éradication totale du paludisme en Europe, Amérique du Nord, Japon, etc. Mais il a été rapidement abandonné du fait de son effet toxique et donc des énormes dommages causés à l'environnement suite à son utilisation en masse (agriculture) et non contrôlée. Les premiers cas de résistance au DDT ont été répertoriés dès 1946 et son utilisation fut abandonnée en 1969. Aujourd'hui, la résistance au DDT, tout comme à bien d'autres insecticides, est largement répandue chez les anophèles. Cependant le DDT est actuellement en réutilisation dans plus de 99 pays sous étroite surveillance (Coleman *et al.* 2008). L'utilisation des pyréthrinoïdes est vivement encouragée du fait de leur faible toxicité pour les hommes et donc sur l'environnement et leur rémanence prolongée. Ces insecticides allient un effet répulsif et létal pour les insectes (Guillet *et al.* 2001).

La résistance constitue le problème majeur à l'utilisation des insecticides, elle est aussi apparue pour les insecticides de nouvelle génération comme les pyréthrinoïdes. Ces difficultés, sont à l'origine de nouvelles réflexions sur les stratégies de lutte contre les moustiques adultes, ainsi le concept d'association avec une protection individuelle est mis en avant.

Les aspersion intra-domiciliaire ont principalement un impact sur les populations de vecteurs endophiles et anthropophiles comme *An. gambiae* et *An. funestus*. Elles sont particulièrement conseillées pour la prévention des épidémies à la suite de signaux d'alarmes telles que de fortes pluies, migration des sujets non-immuns, augmentation des températures minimales.

Moustiquaires imprégnées

Les moustiquaires constituent une barrière mécanique visant à diminuer la transmission des *Plasmodium* et leur imprégnation par des insecticides vise à réduire la population d'*Anopheles*. Dans la mesure où les espèces d'anophèle se nourrissent habituellement le soir et la nuit, une moustiquaire peut réduire radicalement le nombre de piqûres infectieuses reçues par une personne.

Préconisée par tous les traités de médecine tropicale depuis le début du XX^{ème} 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 et les nuisances qu'ils causent (Hougard *et al.* 2002). L'OMS approuve au début des années 1980 l'imprégnation des moustiquaires par des pyréthrinoïdes. Diverses études ont montré que l'imprégnation des moustiquaires réduit sensiblement la transmission du paludisme (Carnevale *et al.* 1991). En effet, l'utilisation des moustiquaires imprégnées dans une communauté entraîne une protection au niveau individuel en protégeant l'utilisateur contre les piqûres et au niveau collectif en réduisant les populations de vecteurs (Hawley *et al.* 2003). Les moustiquaires imprégnées empêchent également les moustiques de se nourrir, ce qui réduit le potentiel reproducteur des espèces très anthropophiles. Plus d'une vingtaine d'études réalisées sur les moustiquaires imprégnées dans différentes régions du monde rapportent une réduction de 17 à 48% des accès palustres et de 20% la mortalité infanto-juvénile qui lui est associée (Alonso *et al.* 1991; Snow *et al.* 1996). Des études estiment à 370 000 décès dus directement au paludisme qui pourraient être évités si une distribution à grande échelle de moustiquaires imprégnées était conduite en Afrique sub-saharienne (Nevill *et al.* 1996). Dans les régions à forte densité anophélienne, l'efficacité de cette technique est plus limitée, il est nécessaire d'associer la lutte anti-vectorielle à d'autres moyens de protection.

Le développement des phénomènes de résistance des anophèles aux insecticides d'imprégnation (Chandre *et al.* 1999; N'Guessan *et al.* 2007) et leur influence supposée négative sur l'immunité anti-paludisme chez l'homme (Muller *et al.* 2006) ont remis en cause leur efficacité comme stratégie unique contre le paludisme (Trape 2001). A cet effet, de nouvelles méthodes d'imprégnation visant à réduire ces phénomènes de résistance ont été mises en place. Il s'agit notamment de l'utilisation d'un répulsif seul ou associé à un insecticide non pyréthrinoïde (Asidi *et al.* 2005; Pannetier *et al.* 2007 {Asidi, 2005 #723}) et de l'association d'un pyréthrinoïde et de produits appelés synergistes inhibant les enzymes de détoxification des insecticides. L'utilisation d'autres insecticides est également développée (Chouaibou *et al.* 2006).

L'OMS recommande un usage généralisé des moustiquaires imprégnées et appuie les initiatives de distribution gratuite (RBM 1999). De remarquables progrès ont déjà été enregistrés dans le taux de couverture de certains pays. C'est ainsi qu'au Togo, le taux de couverture est passé de 2% à 54% en seulement 5 ans (CDC 2005).

Les problèmes posés sur l'utilisation des moustiquaires restent essentiellement un problème d'acceptation et de coût.

La lutte génétique avec les moustiques transgéniques génère beaucoup de recherches fondamentales mais son application ne semble pas envisagée pour le moment à grande échelle (James 2005).

2.3 - Stratégies préventives de transmission

2.3.1 - Vaccins

La mise au point de vaccin dans le cadre des maladies à transmission vectorielle a particulièrement été développée dans le cadre de la lutte contre le paludisme. Peu de travaux ont été recensés concernant la maladie du sommeil.

Vaccins anti-parasites

Les infections plasmodiales et trypaniques sont naturellement des infections chroniques. Cela signifie que les parasites, au cours de leur évolution et de leur adaptation à leur hôte humain, ont su développer des stratégies efficaces pour échapper au système immunitaire d'individus immunocompétents. La mise au point de vaccins contre les plasmodiums et les trypanosomes est rendue particulièrement difficile par le phénomène de variation antigénique concernant les protéines de surface de ces parasites du à l'expression alternative de certains gènes ou bien dans d'autre cas, au réarrangement de site d'ADN du génotype du trypanosome. Ils peuvent ainsi s'adapter à des changements d'environnement ou échapper à une pression sélective telle que la réponse immune de l'homme, en changeant périodiquement les glycoprotéines exprimées à leur surface ou à la surface des globules rouges infectés par le plasmodium. Les parasites possèdent de nombreux gènes codant pour des antigènes « exposés » (immunodominants) tels que les gènes *vsg* (1000 gènes) chez

Trypanosoma et var (50 gènes), *rif*, *stevor* et *Pf60* chez *P. falciparum*. Les parasites peuvent exprimer alternativement des formes sérologiques différentes de ces gènes au cours de leur développement chez un même hôte grâce à une régulation génique sophistiquée. La cinétique du remplacement doit être programmée en sorte que le remplacement de la population des parasites responsables de l'infection doit apparaître dans une sous-population minoritaire avant que la population dominante soit détruite. Ces protéines de surface initient une réponse immunitaire efficace, mais la variation des épitopes de ces molécules très antigéniques permet aux parasites d'échapper à la réponse humorale et cellulaire de l'hôte. Chez *P. falciparum*, il a été estimé que 2% des parasites varient lors de chaque cycle érythrocytaire.

De plus, les populations parasitaires rencontrées dans une population humaine peuvent avoir des phénotypes différents (diversité des espèces). Le polymorphisme phénotypique de *P. falciparum* et de *T. b. gambiense* peut également être impliqué dans l'évasion immune. La mise au point de vaccin est également rendue difficile par le fait que les parasites au cours de leur développement chez l'homme, passent par plusieurs stades parasitaires caractérisés par une composition antigénique différente et induisant des types de réponse immunitaire différente.

Vaccins anti-trypanosomes: Concernant les trypanosomes, au regard des difficultés liées aux variations antigéniques, les recherches de candidats vaccinaux s'orientent vers l'identification d'antigènes invariants impliqués dans le contrôle de l'immunité parasitaire ou des protéines invariantes (enzymes, transporteurs...) uniques à ces parasites comme les récepteurs de surface localisés au niveau de la poche flagellaire du parasite (Overath *et al.* 1994). Des protéines intracellulaires invariables ont également été mises en évidence, c'est le cas par exemple des MAPs (Microtubules Associated Proteins) et plus particulièrement de la p52 qui est une protéine glycosomale. Des rats et des souris immunisés avec cette protéine ont présenté une protection contre différentes souches de trypanosomes et le sérum de ces animaux pouvait entraîner une agrégation des parasites *in vitro* (Balaban *et al.* 1995). Toujours en utilisant des MAPs spécifiques au trypanosome, p15, d'autres immunisations ont été réalisées mais cette fois en utilisant comme vecteur vaccinal un adénovirus. Ce dernier a permis de développer une réponse immunitaire non spécifique, en effet une protection parasitaire *in vivo* a été obtenue tout en développant une prolifération des lymphocytes T CD8+ (Rasooly *et al.* 2004).

Le concept de « vaccin anti-maladie » est également développé, l'inactivation de facteurs pathogènes, grâce à une réponse anticorps appropriée peut moduler la pathologie associée à l'infection. Des facteurs immunomodulateurs tels que le TLTF (T-lymphocyte triggering factor) qui induit une suppression des CD8+, et le TSIF (trypanosome Suppressive Immunomodulatory Factor) qui supprime l'activation des macrophages et des LT sont de potentiels candidats vaccinaux.

Le premier problème de la thérapie vaccinale est la recherche de l'antigène stable du parasite permettant une réponse immunitaire suffisamment importante et efficace pour toutes les souches. Cette recherche vaccinale semble pour l'instant assez aléatoire et aucun test n'a été fait à grande échelle sur des animaux et encore moins chez l'homme.

Vaccins anti-Plasmodium : Jusque dans les années 1990, les recherches pour la mise au point de vaccins antipaludiques ont été menées principalement dans des modèles animaux (Kwiatkowski *et al.* 1997) biaisant ainsi la sélection de candidats vaccins. Néanmoins, des essais ont montré qu'il était possible de protéger des animaux (Stowers *et al.* 2001), ou des hommes (Alonso *et al.* 2004; Graves *et al.* 2003; Kester *et al.* 2001) contre des infections expérimentales ou naturelles avec des protéines recombinantes ou des vaccins ADN.

Actuellement, il existe au moins 94 candidats vaccins antipaludiques. Ils sont dérivés de seulement une vingtaine d'antigènes (Figure 26). Les candidats vaccins se distinguent d'abord par les stades parasitaires auxquels les antigènes sont exprimés. De ces stades dépend l'effet attendu du vaccin et le type de réponse immune susceptible d'être protectrice.

Les vaccins contre les stades pré-érythrocytaires doivent induire la production d'anticorps (Ac) neutralisant à titres élevés contre les sporozoïtes ou les schizontes hépatiques (Stoute *et al.* 1997). 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%. Dans le cas contraire le vaccin ne pourrait que retarder de quelques heures à quelques jours la survenue de manifestations cliniques. Les vaccins en cours de développement essayent d'induire une réponse Ac contre la CSP (*CircumSporozoite Protein*), une protéine immunogénique majeure du stade sporozoïte. Le vaccin RTS,S a donné les résultats les plus encourageants au Mozambique dans les essais de phase II (Alonso *et al.* 2004; Bojang *et al.* 2001) en protégeant 48% des accès palustres simples des 63 volontaires infectés expérimentalement (Snounou *et al.* 2005). Cependant, la réponse Ac spécifique observée dans les populations vivant en zone d'endémie est généralement brève et peu élevée. Au Mozambique, chez des enfants, la vaccination par ce candidat a diminué de 45% le risque

de nouvelle infection et de 30% le risque d'accès palustre simple pendant 6 mois (Alonso *et al.* 2004). Cet effet sur la morbidité aurait persisté au cours de l'année suivante (Alonso *et al.* 2005). Les résultats du même essai clinique suggéraient une réduction de 57% du risque de paludisme grave au cours des 6 premiers mois. Une part importante de l'efficacité de ce vaccin pourrait être liée à un effet non spécifique de son adjuvant, le AS02A (Snounou *et al.* 2005). D'autres vaccins CSP en cours de développement n'ont pas encore dépassé la phase II (essais en zone endémique); aucun n'a donné de meilleur résultat que le RTS,S (Hill 2006); D'autres candidats vaccins visent à induire une réponse à médiation cellulaire T (Th1) 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*).

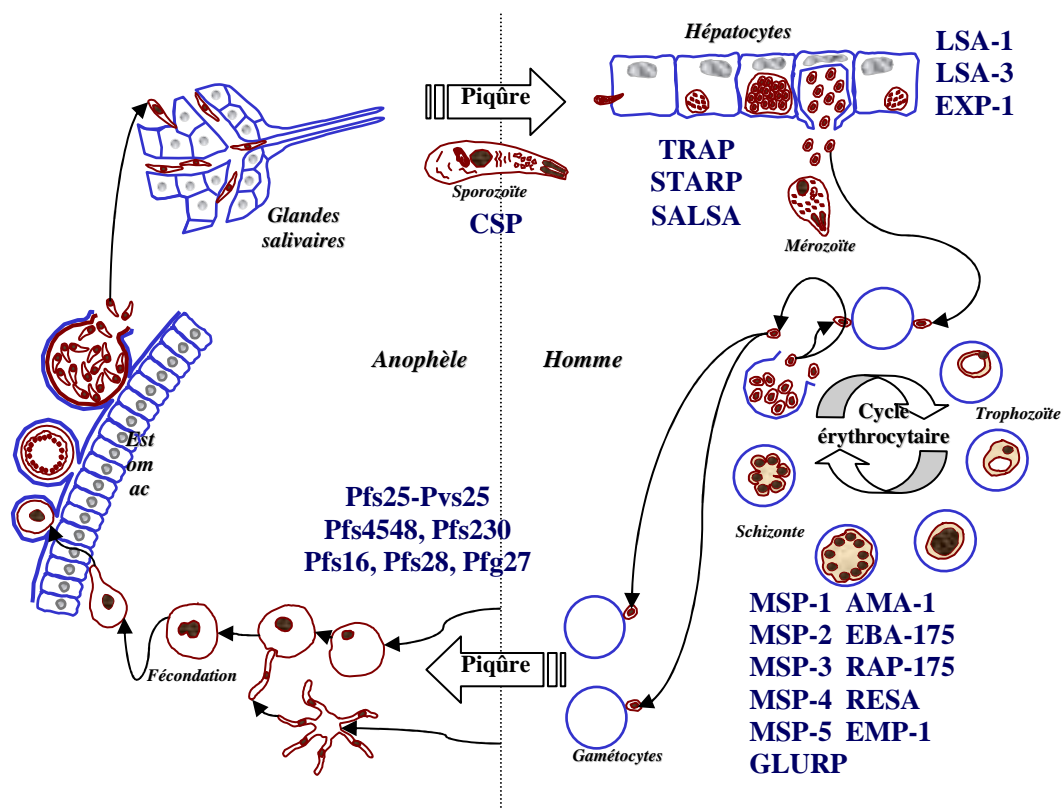


Figure 26. Représentation schématique des antigènes candidats vaccins.

La mise au point d'un vaccin contre les stades érythrocytaires 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. La principale cible de vaccins contre les

stades sanguins asexués est le mérozoïte. En quelques secondes, les mérozoïtes adhèrent aux globules rouges, se réorientent par rapport à la membrane érythrocytaire et modifient les structures membranaires pour envahir les hématies en formant des vacuoles parasitophores. Ils échappent alors aux anticorps. Plusieurs protéines parasitaires sont impliquées dans ce processus complexe (par exemple MSP-1). Elles sont exprimées en surface de la membrane parasitaire et sont donc exposées aux anticorps pendant une très brève période. D'autres antigènes parasitaires pourraient être impliqués dans la physiopathologie du paludisme, dont le neuropaludisme. Parmi ceux-ci, on retrouve des antigènes comme PfEMP-1 qui est codé par les gènes *var* caractérisés par une variation antigénique et qui seraient impliqués dans les phénomènes de cytoadhérence des hématies parasitées à l'endothélium vasculaire. On retrouve également le GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) qui serait impliqué dans la libération de médiateurs pro-inflammatoires au moment de la rupture des schizontes. Les hématies n'expriment pas les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH 1 et 2). A ces stades, les parasites ne peuvent être atteints que par des anticorps, par des réponses à médiation cellulaire dépendantes des anticorps (ADCI & ADCC) ou par la lyse cellulaire dépendant du complément. 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 vaccins en cours d'études pré-cliniques sont MSP-2, MSP-4, MSP-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 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.

Enfin 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. Un tel vaccin altruiste ne protégerait pas l'individu vacciné, mais limiterait la transmission des parasites de l'homme au vecteur, et secondairement du vecteur à l'homme. Si la couverture ou l'efficacité vaccinale ne sont pas totales, un petit nombre d'individus infectés suffirait malheureusement à assurer la transmission du paludisme. De tels vaccins, pourraient être utiles dans les régions de paludisme instable, où la transmission est 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. 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.* 2005; Malkin *et al.* 2005). L'efficacité de ce type de vaccin n'a encore jamais été évaluée sur des populations vivant en zone d'endémie.

L'exploration des mécanismes immunologiques expliquant l'immunité "anti-pathologie" correspondant à l'immunité de prémunition pourrait être également une source pour développer des vaccins mais aucune des réponses immunes connues ne permet d'expliquer cette immunité de prémunition.

Vaccins anti-vecteurs

La faisabilité d'un vaccin anti-vecteur est basée sur le fait que le vecteur en ingérant le sang de l'hôte ingère aussi certains composants du système immunitaire qui peuvent rester actif chez ce vecteur, jusqu'à trois jours chez les moustiques (Hatfield 1988). L'immunité anti-vecteur a été en premier démontrée en 1939 contre la tique *Dermacentor variabilis* par immunisation d'animaux avec des extraits de tiques (Trager 1939).

Les vaccins contre les diptères hématophages ont été considérés après les années 1970 quand il a été montré que l'inoculation répétées d'extraits de moustiques ou de mouches chez des modèles animaux pouvait réduire ou inhiber la prise du repas de sang, la transmission des pathogènes (en visant une molécule du vecteur nécessaire au cycle du parasite dans le vecteur), la fécondité et induire la mortalité du vecteur (Alger *et al.* 1972; Gakhar *et al.* 2005; Suneja *et al.* 2003). La cible du système immunitaire doit être essentielle au vecteur, exposée aux composants immunitaires ingérés au cours du repas sanguin, de faible abondance. L'intestin moyen des insectes reste une cible privilégiée, il contient le repas sanguin et il fait partie du système neuro-endocrinien et immunitaire des invertébrés (Lavazec *et al.* 2008). Des études ont montré que des Ac anti-intestin moyen ont des effets délétères sur la prise de sang, la fécondité (Ramasamy *et al.* 1988) et la survie des parasites dans le vecteur pouvant se traduire par une diminution d'infectivité du vecteur aux pathogènes (Srikrishnaraj *et al.* 1995). Peu de molécules cibles spécifiques anti-vecteur ont été décrites sauf dans la médecine vétérinaire aboutissant à la commercialisation du vaccin TickGARD^{PLUS} (Jonsson *et al.*

2000): les tiques *Boophilus microplus* se gorgeant sur du bétail immunisé avec la protéine recombinante Bm86 (protéine de microvillosité de cellule intestinale de *B. microplus*) présentaient une réduction de la fécondité et une augmentation de la mortalité de la tique (Willadsen *et al.* 1999). Ces composants peuvent avoir un effet léthal sur les vecteurs, une augmentation de la mortalité a été observée chez *An. stephensi* se gorgeant sur des souris immunisées par des extraits d'intestin moyen (Almeida *et al.* 1998). D'autres tissus peuvent également être la cible vaccinale car les Ac ingérés lors de la piqure peuvent migrer grâce à l'hémolymph des insectes. L'élaboration de vaccin ciblant des composés salivaires antigéniques des vecteurs peut également être une stratégie, ce sujet est discuté dans le chapitre "5.6 – Approche vaccinale".

2.3.2 - Réduction du contact homme-vecteur

Il faut distinguer les mesures collectives qui correspondent à la lutte anti-vecteur décrite précédemment "2.2 – La réduction des populations de vecteurs et du contact homme-vecteur par la lutte anti-vectorielle" et les mesures individuelles correspondant dans le cas de l'exposition aux glossines à une modification du comportement des hommes et dans le cas de l'exposition aux *Anopheles* par l'instauration de barrière mécanique empêchant ces vecteurs de piquer (moustiquaires imprégnées, thème développé dans "2.2.2 – Lutte contre les populations d'anophèles").

Glossines : une prévention qui passe par la modification du comportement humain ?

Dans le cas de la THA, la densité de vecteur, n'est pas le facteur essentiel, certains foyers peuvent être entretenus par une faible population glossinienne si celles-ci ont des contacts étroits et répétés avec l'homme. Les glossines ont une écologie très liée à l'environnement, le contact entre l'homme et les glossines peut avoir lieu dès lors que l'homme s'introduit au niveau d'un gîte fréquenté par les glossines. D'un point de vue écologique, ces rencontres sont favorisées au niveau des points d'eau où la population effectue les tâches quotidiennes (activités ménagères, pêche, cultures et baignades...).

Le contact homme mouche est très variable d'une région à l'autre et dépend de deux conditions importantes, la limitation des déplacements des glossines et les possibilités pour la mouche de se nourrir ailleurs que sur l'homme. Si des animaux sont présents, l'homme a

moins de risque d'être piqué souvent. La rencontre entre les deux protagonistes n'a pas de caractère saisonnier au sens climatique, elle dépend surtout du comportement humain. En saison sèche, les animaux et les hommes fréquentent plus les points d'eau, en période de grands travaux l'homme est plus présent dans les plantations/rizières. Il est également recommandé d'éviter le port de vêtements sombres qui attirent les glossines, de fermer les vitres des véhicules en déplacement, les glossines étant attirées par le mouvement.

La modification du comportement humain par un aménagement des activités dans le temps et dans l'espace pourrait donc permettre de diminuer les rencontres homme-vecteur de trypanosomes. Afin de mettre des modifications en place il est nécessaire de connaître l'écologie des espèces présentes dans la localité étudiée, il est donc nécessaire de connaître précisément les espèces incriminées.

2.3.3 - Chimio prophylaxie

Cette stratégie préventive est particulièrement développée dans le cadre du paludisme. La morbidité est principalement élevée chez les femmes enceintes et chez les enfants de moins de 5 ans. Le traitement préventif intermittent consiste à administrer aux femmes enceintes au moins deux doses d'un médicament antipaludique, actuellement la sulphadoxine-pyriméthamine (SP), à chaque consultation anténatale programmée après le premier trimestre de la grossesse, qu'elles présentent ou non des symptômes de paludisme. Il a été établi que ce traitement préventif réduit considérablement le risque d'anémie chez la mère, ainsi que l'insuffisance pondérale à la naissance (Vallely *et al.* 2007).

Chez les enfants, l'administration intermittente et systématique d'antipaludiques (amodiaquine ou SP, associée ou non à un dérivé de l'artémisinine) à titre prophylactique est actuellement évaluée dans des essais contrôlés menés dans différents pays (Cisse *et al.* 2006) (Greenwood 2006). Une première intervention a consisté en l'administration de SP + artesunate en trois prises annuelles à l'ensemble des enfants de moins de cinq ans résidant en zone de transmission saisonnière courte du paludisme au Sénégal, en fonction du calendrier des pluies, et non pas de celui des vaccinations. Cette intervention a pu conférer une réduction de 86 % du nombre d'accès palustres chez les enfants ayant bénéficié du traitement préventif. Ce TPI est en grande partie assimilable à une chimio prophylaxie espacée, à dose thérapeutique et de courte durée. Du fait du petit nombre de prises d'antipaludiques sur lequel repose cette nouvelle approche pour prévenir le paludisme, son coût est modeste et sa mise en œuvre

facilitée. Combinant deux antipaludiques différents les souches chimio-résistantes du parasite ne devraient pas apparaître trop rapidement. L'efficacité de ce type de stratégie n'a pas encore été évaluée dans le cadre de programmes de santé publique et son impact sur la sensibilité de *P. falciparum* aux antipaludiques n'a pas encore pu être apprécié.

Concernant la THA, la prophylaxie par la Lomidine (4mg/kg tous les 6 mois) a été proposée mais son efficacité est discutée. De plus, l'inaccessibilité des personnes rend la distribution difficile.

Remarque :

Dans les systèmes de croyances caractéristiques des communautés rurales, ces maladies invalidantes sont fréquemment attribuées à des causes non médicales. Les efforts de lutte reposant sur la participation locale sont parfois difficiles à mener lorsque les populations estiment que ces maladies ne relèvent pas de la médecine mais sont des affections contre lesquelles les êtres humains et la médecine moderne sont impuissants.

Chapitre 3:

De l'évaluation du risque d'exposition au risque d'infection

3.1 - Evaluation du risque d'exposition

La morbidité et la mortalité des maladies à transmission vectorielle sont directement liées à la transmission des parasites par un vecteur infecté et donc à l'exposition des population humaines aux piqûres des vecteurs infectés.

Aujourd'hui les moyens d'évaluer l'exposition de l'homme aux différentes espèces d'anophèles et de glossines sont des méthodes d'échantillonnages entomologiques (captures par pièges, "appât humains", imprégnation intra-domiciliaire d'insecticides pour l'étude de la faune résiduelle, moustiquaires pièges, etc.). Des méthodes sérologiques complémentaires sont également développées, elles permettraient, par l'évaluation de la réponse Ac spécifique aux protéines salivaires des vecteurs, d'identifier les personnes exposées au risque de piqûres par les vecteurs.

3.1.1 - Approche entomologique : évaluation de la densité des populations de vecteurs

Même s'il n'y a pas de proportionnalité stricte entre l'abondance du vecteur et l'intensité de 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. Ces études de terrain permettent de connaître la nature, la composition (sexe, âge, état nutritionnel, état infectieux vis-à-vis du pathogène...), la distribution géographique, l'abondance, les variations saisonnières de l'habitat et les densités ainsi que l'écologie des vecteurs (degré d'anthrophilie et zoophilie, d'endo- et exophilie, endo- et exophagie).

De plus, l'évaluation de la densité des populations adultes, donc du risque d'exposition aux piqûres, est la première démarche afin de définir le risque de transmission (EIR). Cette étape d'échantillonnage entomologique est essentielle afin de mieux définir les campagnes de surveillance et de contrôle effectives et sélectives des populations de vecteurs ; cet échantillonnage est également utilisé pour évaluer l'efficacité de la LAV (Odiere *et al.* 2007).

Les insectes adultes sont capturés selon différentes méthodes élaborées et standardisées à la suite d'études sur le comportement de ces insectes (Service 1977). 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 anophèles ou les glossines adultes agressifs 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.* 1997) 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 piquê/homme/nuit. Il existe une variabilité inter-homme, chaque personne est plus ou moins attractive (et adroite !), 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 sont déconseillées ou non approuvées par les agences sanitaires (Rubio-Palis *et al.* 1992; Sithiprasasna *et al.* 2004)). Concernant les *Anopheles*, 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 : Cette méthode renseigne sur l'abondance des différentes espèces, elle est très utilisée, notamment pour les glossines. Mais elle ne permet 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 restante (*Anopheles*) : Cette technique consiste à recueillir le matin les insectes, par pulvérisation d'insecticide, restés dans l'habitat. Cette méthode renseigne préférentiellement sur les espèces endophiles.

Limites : 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. et il est particulièrement difficile d'estimer les densités réelles de vecteurs pouvant piquer l'homme par rapport à l'échantillon obtenu au regard des différents paramètres pouvant influencer le succès d'échantillonnage. L'extrapolation aux enfants, premières victimes de la morbidité palustre est également difficile (Carnevale *et al.* 1978), des facteurs de correction ont été élaborés à partir des données obtenues pour les adultes dans une même localité (Port *et al.* 1980). Il est recommandé de capturer sur une période suffisamment longue (piégeage continu de 4 jours) afin de réduire l'importance des fluctuations journalières. Pour les anophèles, l'effet de la luminosité de la lune pourrait également agir sur les collectes de nuit (Rubio-Palis 1992). Mais 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 *et al.* 1999), de leur distance aux gîtes larvaires (Smith *et al.* 2004). Les méthodes entomologiques renseignent sur l'exposition moyenne des populations au sein d'un même foyer mais ne permettent pas de mesurer l'hétérogénéité d'exposition entre individus. Par ailleurs, ces méthodes présentent des biais (favorisant une population d'insectes suivant leur écologie) et des limites (sensibilité, évaluation impossible à grande échelle, coûts importants, moyens lourds pour leur mise en place). Ces différentes limites sont encore plus importantes dans un contexte de faible exposition au vecteur (sensibilité). Il serait donc nécessaire de développer de nouveaux outils complémentaires permettant d'évaluer le risque d'exposition des populations humaines aux piqûres des insectes vecteurs.

En complément de l'échantillonnage, l'analyse du repas sanguin des vecteurs permet de déterminer l'origine de l'hôte sur lequel l'insecte s'est nourri. Cette technique consiste à détecter dans le sang absorbé par les vecteurs des Ac spécifiques d'un certain nombre d'hôtes potentiels (homme, bœuf, mouton, poule, cheval, porc...).

Pour l'échantillonnage des stades immatures, les techniques sont variables suivant la biologie des espèces recherchées, pour les moustiques les lieux de pontes aquatiques seront recherchés, pour les glossines, des études de sol sont nécessaires.

3.1.2 - Approche sérologique

Les techniques entomologiques de référence ne sont pas standardisées et de nombreux facteurs biotiques ou abiotiques peuvent biaiser l'échantillonnage. Le développement de stratégies alternatives serait nécessaire afin d'optimiser l'évaluation de l'exposition à un niveau individuel au regard de l'hétérogénéité d'exposition discuté ci-dessus et permettrait également d'augmenter la spécificité à un vecteur donné. 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 "5.8 – Marqueur immunologique d'exposition aux piqûres des vecteurs".

3.1.3 - Approche environnementale intégrée

Les arthropodes vecteurs sont très sensibles aux conditions environnementales (climat, paysage) qui régulent leur dynamique de population. Ces paramètres ont également un impact important sur les dynamiques de transmission de la maladie. 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 ce que les efforts de contrôle et les stratégies d'intervention soient les plus efficaces et ciblées possible. Cette discipline consiste à mettre en relation des paramètres environnementaux dérivés d'images de télédétection avec des données concernant soit la maladie (prévalence parasitaire) 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. La modélisation peut permettre d'établir des modèles prédictifs de l'occurrence spatiale et temporelle de la maladie pour mieux anticiper le risque d'émergence (Rogers 2006). 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. D'autres paramètres "environnement" issus de sources d'information géographique différentes (données météorologiques...) peuvent être inclus dans l'analyse. L'inversion des corrélations permet d'obtenir soit des cartes de risque, soit la prédiction des périodes à risque épidémique. Par exemple, l'analyse de Beck permet de cartographier les villages les plus à risque pour le paludisme dans la région du Chiapas au Mexique (Beck *et al.* 1994).

Des études se sont intéressées à prédire la distribution et l'abondance des populations des *Anopheles* (Lindsay *et al.* 1998) en Afrique. La modélisation de la distribution des glossines a été rapportée avec une exactitude de 80% (Rogers 2000; Rogers *et al.* 1996). Par ailleurs, des données climatiques ont permis de modéliser les taux de naissance et de létalité des glossines et leur densités (Rogers 1979).

3.2 - Évaluation du risque de transmission

Complémentairement au risque d'exposition, il est possible d'évaluer le risque de transmission des pathogènes à l'homme par l'étude des insectes vecteurs ou directement chez l'homme. La transmission dépend de la présence d'insectes compétents (bonne capacité vectorielle), de leur taux d'infection par les pathogènes et de l'intensité du contact homme-vecteur (nombre de piqûres reçues). Il existe donc une relation directe entre le degré d'exposition et la transmission de la maladie.

3.2.1 - Indice de transmission entomologique

Des indices entomologiques permettant de quantifier l'intensité de transmission de *P. falciparum* à l'homme ont essentiellement été développés afin d'évaluer l'hétérogénéité

spatiale de transmission. Le principal indice correspond à la mesure du taux entomologique d'inoculation par unité de temps (EIR= Entomological Inoculation Rate) (Macdonald 1957). Cet indice correspond au nombre de piqûres infectantes que reçoit un homme par unité de temps dans un site donné, ce qui est actuellement la seule façon d'évaluer la dynamique de transmission du paludisme (Burkot *et al.* 1995);

Cet indice est défini par la formule : **EIR = ma.s**

Où **ma** = nombre de piqûres donc le nombre moyen de vecteurs piquant un homme par unité de temps. « ma » dépend essentiellement du nombre de gîtes larvaires potentiels, de la productivité en anophèles des gîtes et de l'exposition de l'homme.
ma est évalué à partir des captures entomologiques (piégeage, appât humain, pulvérisation intradomiciliaire).

s = indice sporozoïtique (=IS) donne le pourcentage d'anophèles porteurs de sporozoïtes dans les glandes salivaires. «s» s'obtient directement par dissection des glandes salivaires des moustiques capturés pour visualiser la présence de sporozoïtes ou par la recherche de l'antigène circumsporozoïtique (CSP) par une méthode ELISA dans la tête et le thorax de l'anophèle (Burkot *et al.* 1984).

Différentes études ont montré une grande variabilité des valeurs de l'EIR à travers l'Afrique (Gilles 1993). 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-soudanais 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 au-dessous 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. Cet indice doit être envisagé en fonction de la répartition des piqûres dans l'année et entre les différentes années. 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).

La mesure de l'EIR n'est pas standardisée et sa mesure dépendra essentiellement de la qualité des captures entomologiques (Githeko *et al.* 1996). Dans un contexte urbain, où les hôtes

humains prédominant, 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.

Concernant l'évaluation du risque de transmission par les glossines, un indice de risque a été défini par Laveissière dans les foyers de maladie du sommeil, utilisant le nombre de glossines ténérales capturées par piège et par jour, la densité apparente par piège et par jour, le nombre de repas sanguins sur l'homme et le taux de mortalité quotidien (Laveissière *et al.* 1997). Cet indice a permis de repérer les sites de transmission majeurs de la maladie du sommeil dans les foyers actifs. Pour être plus proche de la définition de la capacité vectorielle, il devrait cependant tenir compte de l'évolution du parasite chez le vecteur. Le taux d'infection des glossines est mesuré par dissection de leurs glandes salivaires.

3.2.2 - Indice de transmission évalué chez homme

Chez l'homme, l'évaluation de l'intensité de transmission est basée sur l'indice épidémiologique de prévalence qui correspond à la proportion de sujets porteurs de parasites dans un site et à un temps donné. Les indicateurs du taux de prévalence sont obtenus par recensement des taux de parasitémie par les différentes techniques de diagnostic décrites dans le chapitre précédent "2.1 – La réduction de la charge parasitaire". La prévalence et l'incidence parasitaires n'auront pas les mêmes répercussions en tant qu'indices dans le cadre du paludisme ou de la THA. Dans le cas de la THA toute mise en évidence de la présence de parasite est importante. Le dépistage actif par des équipes mobiles en complément des études entomologiques reste la meilleure stratégie afin de localiser les personnes infectées et les foyers où les parasites circulent. Dans le cas du paludisme, dans les zones de forte transmission, plus de 90 % des porteurs sont asymptomatiques et au regard de leur immunité de prémunition développée, peu de personnes déclencheront des accès sévères.

La prévalence est évaluée par l'indice parasitaire: un sujet positif aura au moins un parasite dans deux cents champs de gouttes épaisses lors de l'examen microscopique dans le cadre du paludisme. On définit également la densité parasitaire qui correspond au nombre de parasites

par microlitre de sang chez un porteur de parasite. La DP se calcule en comparant le nombre de parasites par champs ou par nombre de leucocytes (en général sur 200 leucocytes) ou d'hématies.

L'étude de la réponse Ac contre certains antigènes des stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires de *P. falciparum* semble représenter une «image» du degré de transmission. Des protéines des stades précoces (CSP, TRAP, LSA1, SALSA...) considérées pour leur activité immunogène 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 du stade mérozoïte et sporozoïte 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, 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).

Remarque:

En Afrique, les statistiques sanitaires sont trop incertaines pour dresser un état du nombre de cas exacts, Dans le cadre des 2 modèles étudiés, l'asymptotisme de longue durée dans les premiers stades des infections ne rend pas efficace une surveillance passive. Cela est vrai pour la maladie du sommeil où en plus d'une phase asymptomatique de longue durée s'ajoute un diagnostic difficile à établir. Le dépistage exhaustif des populations par la mise en place de prospections médicales par des équipes mobiles qui vont à la rencontre des personnes est sûrement le meilleur moyen pour identifier les populations exposées et de détecter tous les cas de trypanosomiase (en première comme en seconde phase), et de les traiter afin de minimiser la transmission. Différentes études ont montré que des programmes de dépistage et de traitement diminuaient l'incidence de la THA (Bruneel *et al.* 1994)(Simarro *et al.* 1991). La détection des personnes parasitées doit être la plus précoce possible. La mise en place d'observatoires sentinelles basés sur la collecte des données dans les structures de soins est une action essentielle dans le système de surveillance. Dans les régions de paludisme stable, 90% des porteurs sont asymptomatiques, ils ne seront pas comptabilisés si ce n'est lors d'enquêtes épidémiologiques spécifiques de prévalence. Un bon système d'information sanitaire est indispensable afin de collecter les informations entre les différentes instances

sanitaires et de les centraliser au niveau des plans nationaux de lutte. Les périodes de guerre ou d'instabilité politique peuvent influencer les systèmes de santé, des modifications climatiques favorisant la transmission comme une augmentation de la pluviométrie peuvent être à l'origine d'épidémies (Lindblade *et al.* 1999).

Chapitre 4

Diversité et fonctions des protéines salivaires

La transmission des pathogènes par un arthropode vecteur entre deux hôtes a communément lieu lors d'un repas sanguin. Chez la majorité des arthropodes vecteurs dont les moustiques *Aedes*, *Culex* et *Anopheles*, seule la femelle est hématophage, elle a besoin des protéines contenues dans le sang pour la maturation de ses œufs (Clements 1992). Ce dimorphisme, quand il existe, a des conséquences sur la morphologie des glandes salivaires et sur la composition des sécrétions salivaires (Janzen *et al.* 1971). Les glandes salivaires des moustiques sont des organes pairs localisés au niveau du thorax. Chaque glande est constituée de trois lobes: deux lobes latéraux et un lobe médian (Figure 27). Les glandes salivaires des mâles sont plus petites, 1/5 de la taille de celles des femelles et ne sont constituées que d'un seul type cellulaire (James 1994).

Les glandes femelles montrent une histologie complexe avec de nombreux types cellulaires. Les lobes distaux-latéraux et médians, régions associées à la sécrétion de protéines salivaires nécessaires au repas sanguin, sont uniquement retrouvés chez la femelle (James *et al.* 1991; Rossignol *et al.* 1984). Chez certaines espèces d'arthropodes, les deux sexes sont hématophages (tiques, glossines). Néanmoins une différence dans la composition salivaire a été observée entre les glossines mâles et femelles (Li *et al.* 2001).

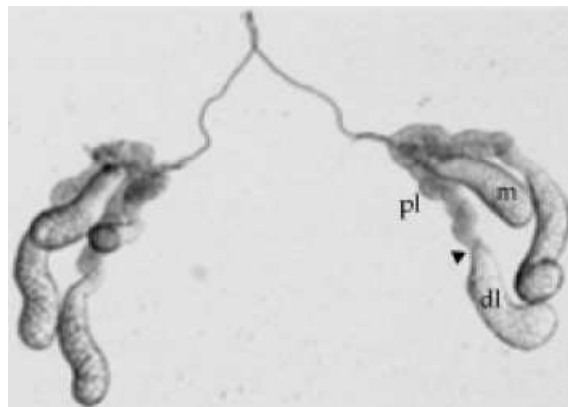


Figure 27. Paire de glandes salivaires d'*An. gambiae* adulte femelle. Les lobes médian (M), proximaux-latéraux (PL) et distaux-latéraux (dl) sont indiqués.
D'après (Lombardo *et al.* 2006).

Deux techniques de prélèvement de sang ont été décrites chez les arthropodes hématophages (Lavoipierre 1965). Les arthropodes dits solénophages (moustiques et punaises) prélèvent le sang directement dans le capillaire sanguin grâce à des appendices longs qui permettent de perforer les tissus de l'hôte et les arthropodes dits telmophages (glossines, phlébotomes, simulies, tiques) prélèvent le sang à partir d'hémorragies créées par

rupture physique des tissus et des parois vasculaires grâce à leurs appendices courts et lacérants.

La durée du repas sanguin est variable selon les espèces d'arthropodes: il dure de quelques minutes chez les *Culicidae* à plusieurs semaines chez les tiques. L'insecte doit localiser dans un premier temps un vaisseau sanguin, c'est la phase de "probing" (Gillett 1967; Ribeiro *et al.* 1985). Elle consiste en un tâtonnement du derme par les pièces buccales de l'insecte, le labium pénètre et recherche activement un capillaire sanguin. Une fois le vaisseau localisé, l'insecte se nourrit de sang. La pénétration du labium au moment du probing ou de la prise de sang engendre une réponse de la part de l'hôte vertébré de type hémostatique (agrégation plaquettaire, coagulation et vasoconstriction), inflammatoire et immunitaire ; ces réponses naturelles permettent de minimiser les pertes de sang des capillaires, veinules et artérioles en quelques secondes. Les insectes hématophages doivent pouvoir contrer les trois réponses de l'hôte pour mener à terme le prélèvement de sang. Pour cela, ils injectent des microquantités de salive dans l'espace extravasculaire de la peau à plusieurs reprises durant la pénétration des pièces buccales (Amino *et al.* 2007; Ribeiro *et al.* 1984). Les pathogènes sont transmis lors de cette sécrétion de salive au niveau du derme de l'hôte.

On estime que les moustiques injectent 50 à 60% de leurs facteurs salivaires actifs pendant le repas et qu'ils en réingèrent 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). Concernant les glossines, chaque glande salivaire contiendrait environ 4µg de protéines salivaires solubles et 50% serait injecté au moment de la piqure (Van Den Abbeele *et al.* 2007). La transcription des protéines salivaires a lieu dans les 48h suivant le repas sanguin alors que chez les moustiques, le maximum de cette synthèse est observée uniquement 48h après le repas de sang (Yoshida *et al.* 2006).

Les contraintes imposées aux insectes hématophages par la réponse hémostatique des vertébrés ont amené les insectes, au cours de leur évolution, à mettre en place des stratégies efficaces contre les réponses de leur hôte préférentiel, expliquant la diversité des protéines salivaires (structure et fonction) entre les différents insectes hématophages (Champagne 2004) (Ribeiro 1995). 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 sous familles. Néanmoins certaines protéines salivaires sont communes à beaucoup d'espèces.

Certaines protéines salivaires ont des propriétés immunogéniques pouvant entraîner une immunomodulation au niveau du site de piqure. Ces modifications peuvent avoir des conséquences sur la transmission et le développement des pathogènes chez l'hôte vertébré.

4.1 - Propriétés pharmacologiques

4.1.1 - Inhibition de l'agrégation plaquettaire

L'agrégation plaquettaire est la première ligne de défense de l'homme pour éviter la perte de sang lors d'une blessure, elle se met en place très rapidement.

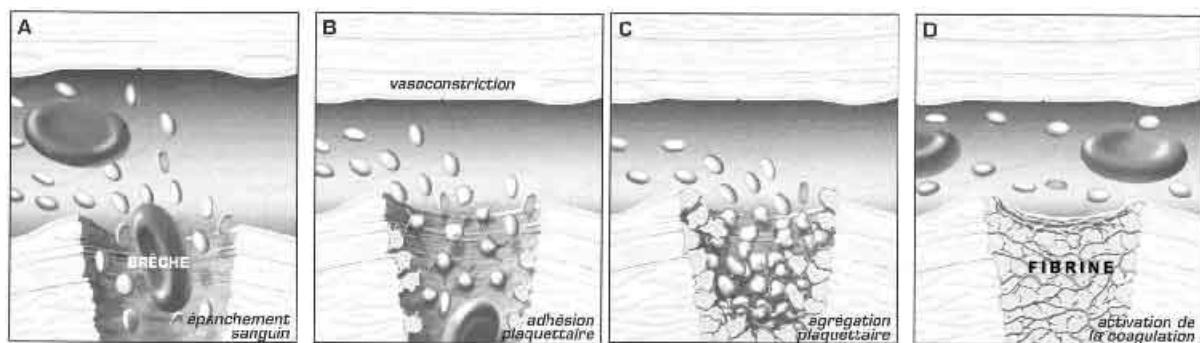


Figure 28. Formation du thrombus blanc.
D'après (Boneu *et al.* 1997).

La lésion de l'endothélium par les pièces buccales entraîne une libération d'ADP (Adénosine Di Phosphate) par les cellules endommagées et de collagène par les cellules sous-endothéliales. Les plaquettes, présentes dans le sang, réagissent à cette augmentation d'ADP en adhérant entre elles et au sous endothélium, elles s'activent. Elles changent alors de conformation et vont libérer le contenu de leurs granules. Les granules denses contiennent notamment de l'ADP, de la sérotonine et du thromboxane A₂ (TXA₂). L'ADP renforce l'agrégation plaquettaire (Shattil *et al.* 1994) tandis que la sérotonine et le TXA₂ provoquent une vasoconstriction qui participe à l'hémostase en diminuant le flux sanguin. Ces mécanismes se traduisent par une agrégation plaquettaire qui forme le thrombus blanc (Figure 28). 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. D'autres agonistes, comme la thrombine, peuvent activer les plaquettes.

La salive des insectes contient des molécules anti-agrégantes pour fluidifier le sang et permettre ainsi une prise du repas sanguin plus rapide et complète. Les différents travaux ont montré l'existence d'une diversité de nature, de structure et du mode d'action de ces protéines en fonction des espèces comme indiqué dans la figure 29.

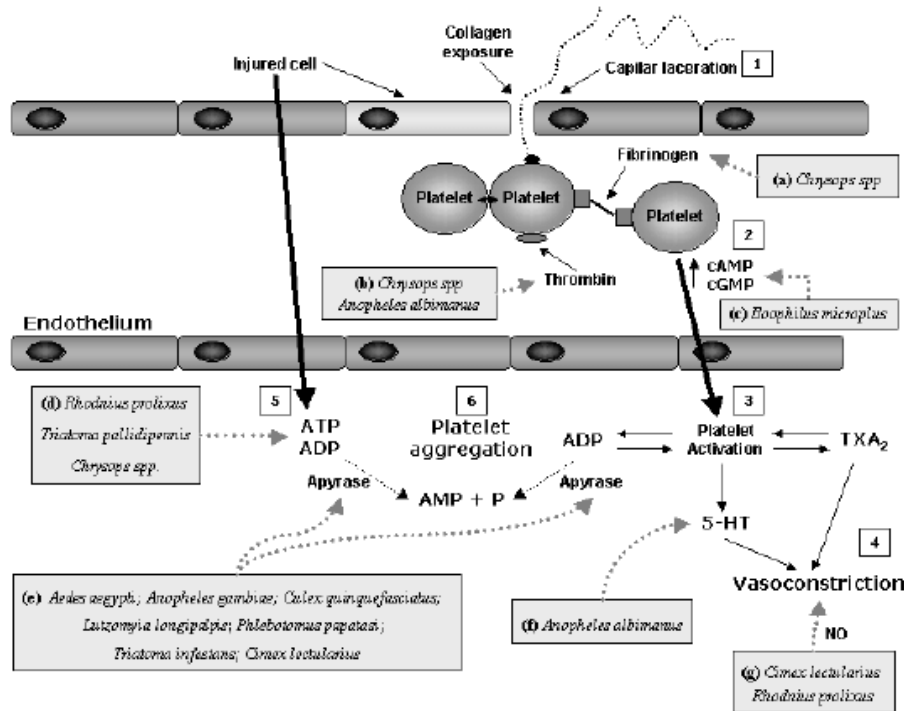


Figure 29. Effet de la salive des arthropodes vecteurs sur l'agrégation plaquettaire. D'après (Andrade *et al.* 2005).

Apyrase

L'apyrase est la protéine la plus communément retrouvée entre les espèces hématophages, elle a été décrite chez de nombreuses espèces d'arthropodes. Elle hydrolyse l'ADP et l'ATP en AMP et en phosphate inorganique, permettant ainsi de diminuer le taux d'agoniste ADP au niveau du site de lésion et donc de minimiser l'activation des plaquettes. Elle intervient également dans l'inhibition de la réaction inflammatoire (Ribeiro *et al.* 1991).

Deux types d'apyrase ont été décrits. Chez *Aedes aegypti* (Champagne *et al.* 1995), *Anopheles* (Arca *et al.* 1999), *Culex* (Nascimento *et al.* 2000), *Glossina morsitans* (Van Den Abbeele *et al.* 2007) et *Triatoma* (Faudry *et al.* 2004), cette protéine appartient à la famille des 5'-nucléotidases. Une apyrase appartenant à une nouvelle famille de protéines a été observée chez d'autres insectes tels que *Cimex lectularius* et chez les phlébotomes (Valenzuela *et al.*

2001; Valenzuela *et al.* 1998) et chez les phlébotomes { Valenzuela, 2001 #40). Ces 2 genres d'apyrase diffèrent, suivant les espèces, par leur pH optimal d'action et dans la nature des cations divalents requis pour leur activation (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) (Ribeiro 1987).

Cette protéine est également retrouvée chez les simuliés (Cupp *et al.* 1997) et *Rhodnius* (Sarkis *et al.* 1986). Elle est exprimée préférentiellement dans le lobe distal des glandes salivaires des femelles (Smartt *et al.* 1995) alors que les moustiques *Aedes* mâles présentent un taux de cette protéine vingt fois inférieur (Ribeiro *et al.* 1984). Elle semblerait absente chez les mâles *Anopheles* (Calvo *et al.* 2006). 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.* 1985).

Autres anti-plaquettaires

La pallidipin de *Triatoma pallidipensis* (Noeske-Jungblut *et al.* 1994) et la moubatine d'une espèce de tique (Waxman *et al.* 1993) sont des protéines de la famille des lipocalines. Elles inhibent l'agrégation plaquettaire en agissant sur le collagène (Montfort *et al.* 2000). Chez *Glossina morsitans morsitans*, deux inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire ont été identifiés, l'un d'eux ayant aussi une activité anti-thrombine (Mant *et al.* 1981).

4.1.2 - Inhibition de la coagulation

Parallèlement à l'agrégation plaquettaire, le mécanisme de coagulation proprement dit va se mettre en place : le fibrinogène du plasma va être transformé en un réseau de fibrine insoluble qui va consolider le caillot plaquettaire. Ce processus fait intervenir une cascade d'activation de précurseurs circulants inactifs qui doivent être clivés (perte d'une partie de leur chaîne protéique) pour être activés (Figure 30). 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.

Le déclenchement de la voie de coagulation extrinsèque ou exogène est essentiellement dû à la libération du facteur tissulaire à partir des cellules lésées. 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. L'activation de la voie endogène ou intrinsèque (système contact) est médiée par le complexe prékallikréine – HK (high molecular weight kininogen) qui active le facteur XII (Rojkjaer *et al.* 1999). La cascade résulte en la production de thrombine (facteur IIa) sous l'influence du facteur Xa. La thrombine va permettre aux chaînes de fibrinogène de s'associer et de polymériser en un réseau de fibrine insoluble. Le fibrinogène est synthétisé par le foie et est retrouvé 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.

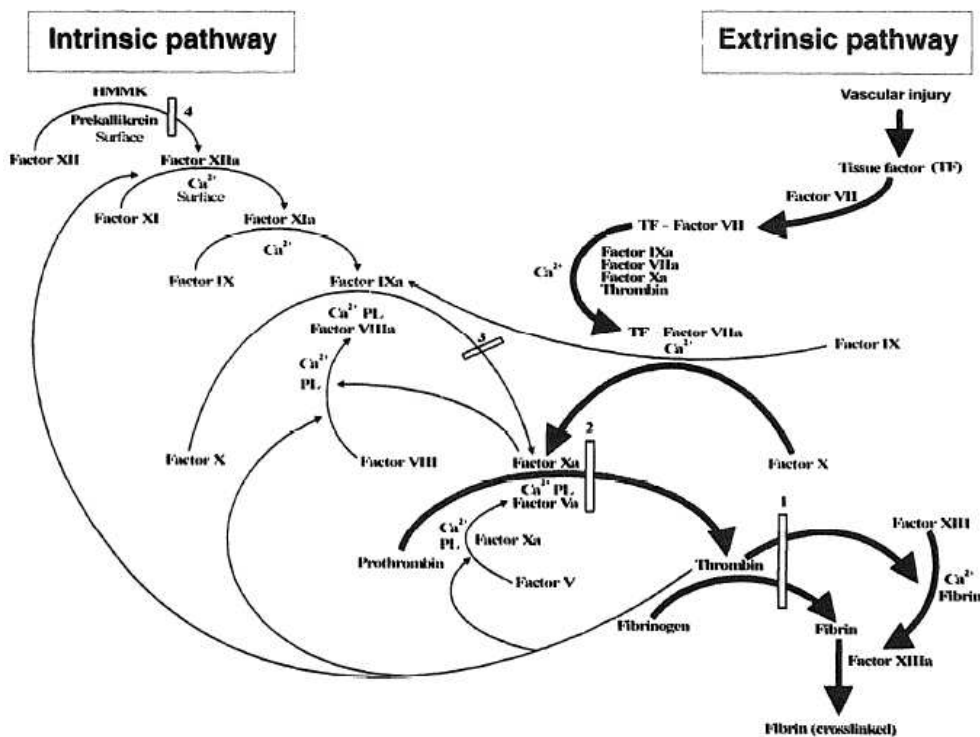


Figure 30. Voies de coagulation chez l'homme.
D'après (Davie *et al.* 1991).

Les insectes hématophages ont mis au point des stratégies afin de détourner le processus de coagulation. Certains produisent des facteurs anti-coagulants, d'autres synthétisent des molécules qui interagissent à différents niveaux dans la formation du caillot. Elles ciblent spécifiquement les protéines de type sérine-protéases ou les complexes de la cascade de coagulation dans le but de bloquer ce processus le temps que le moustique prenne son repas sanguin (Valenzuela 2002) (Figure 31).

Inhibition des facteurs de la cascade de coagulation

La thrombine est un élément indispensable à la coagulation de l'homme: elle accélère la cascade de coagulation, transforme le fibrinogène en fibrine et stimule directement l'agrégation plaquettaire.

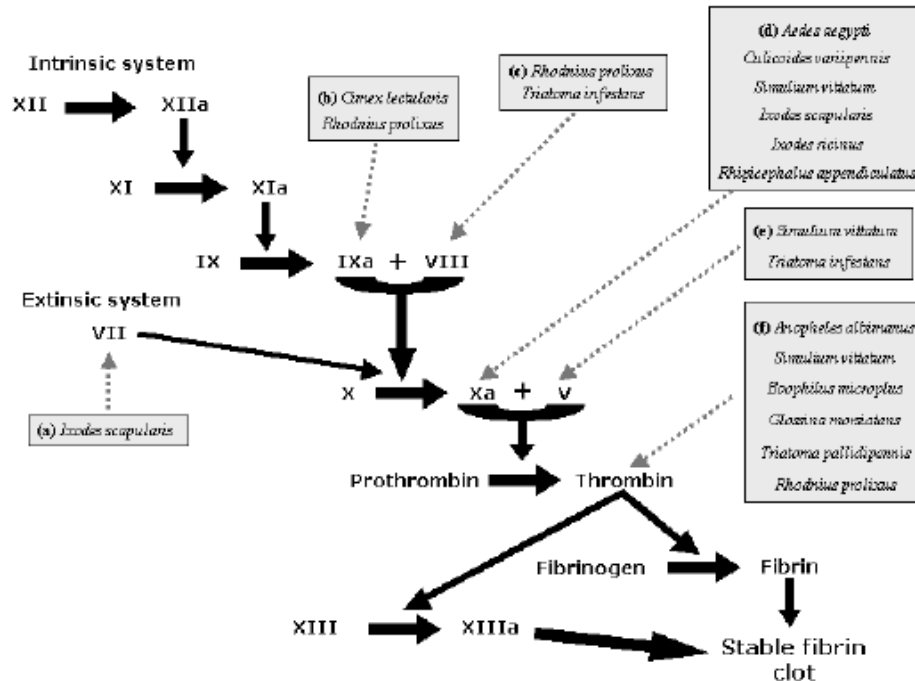


Figure 31. Effet de la salive des arthropodes vecteurs sur la cascade de coagulation.
D'après (Andrade *et al.* 2005).

L'anopheline de *An. albimanus* (Francischetti *et al.* 1999; Valenzuela *et al.* 1999) et des composés salivaires de tiques (Anastopoulos *et al.* 1991)(Hoffmann *et al.* 1991), de triatomes (Noeske-Jungblut *et al.* 1995) et de *Glossina morsitans* (Parker *et al.* 1979) ont une action directe sur la thrombine. Le tsetse thrombin inhibitor (TTI, 32 aa) est le composé majeur retrouvé dans les glandes salivaires de *Glossina morsitans morsitans* (Cappello *et al.* 1996; Cappello *et al.* 1998).

L'inhibition des autres facteurs de coagulation a également été rapportée. Les *Culicidae* possèdent une molécule qui inhibe directement le facteur Xa en présence de Ca^{2+} (Stark *et al.* 1998). Une activité anti-Xa a également été reportée chez de nombreux vecteurs : les tiques (Jordan *et al.* 1990), Culicoïdes (Perez de Leon *et al.* 1998), *Simulium vittatum* (Abebe *et al.* 1995)(Jacobs *et al.* 1990) et chez les glossines (Cappello *et al.* 1996). L'inhibition d'autres facteurs de coagulation (anti-Va, -VIIa, -VIIIa, -IXa et -XIIa) a été reportée chez d'autres espèces (Campos *et al.* 2004). Une protéine anticoagulante de la salive de *Rhodnius prolixus*, (prolixine-S) correspondant à la nitrophorine 2, molécule vasodilatatrice, inhibe la voie de

coagulation intrinsèque et extrinsèque en empêchant l'activation du facteur X en se liant au facteur VIII ou IX (Ribeiro *et al.* 1995).

Des protéines appartenant à la famille D7 interviennent également dans l'inhibition de la coagulation. La description de ces protéines est faite dans un prochain chapitre.

4.1.3 - Vasodilatation

Le sang n'est pas très abondant au niveau de la peau des vertébrés, il représente moins de 5% du volume total de la peau (Ribeiro 1987). 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 deux protagonistes. La salive contient des substances vasodilatatrices qui dilatent les vaisseaux au voisinage du site de piqûre et accélèrent le flux sanguin. Ces substances peuvent également annihiler l'effet des vasoconstricteurs endogènes (TXA2 et sérotonine) libérés par l'activation des plaquettes. De nombreux vasodilatateurs ont été caractérisés au niveau moléculaire.

Catechol Oxidase/peroxidase

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

Peptides à action vasodilatatrice

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

Le maxidilian (MAX), découvert chez *Lutzomyia longipalpalis* (Lerner *et al.* 1992), est un vasodilatateur à action persistante qui présente également des propriétés immunogéniques impliquées dans l'exacerbation de la pathologie de la leishmaniose (Titus *et al.* 1988). Les phlébotomes de l'ancien monde (*Phlebotomus papatasi*) eux ne possèdent pas la protéine maxidilan 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 maxidilan (Cupp *et al.* 1998).

Les moustiques du genre *Aedes* possèdent deux tachykinines appelées Sialokinine 1 & 2 (Champagne *et al.* 1994; Ribeiro 1992) qui miment l'action de la substance P, peptide endogène, qui stimule la production de l'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales, engendrant une dilatation des vaisseaux sanguins. Ces peptides possèdent des activités immunomodulatrices, elles modulent l'activation des macrophages et la présentation d'antigènes (Brunelleschi *et al.* 1990) (Eglezos *et al.* 1991).

Oxyde nitrique

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.* 1995; Ribeiro *et al.* 1994). Elles sont stockées dans le lumen des glandes salivaires, le NO est synthétisé par une NO synthetase 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 *et al.* 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 relarguage de NO a aussi été retrouvé chez le vecteur *Cimex lectularius* (Valenzuela *et al.* 1998).

Prostaglandines

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

4.1.4 - Inhibition de 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 deux derniers signes résultant d'une vasodilatation locale.

Le complexe prékallikréine – HK et le collagène libéré par les cellules lésées vont activer la voie endogène ou système contact (Figure 30) qui libère de la bradykinine, un médiateur de l'inflammation, responsable d'une vasodilatation, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la sensibilité à la douleur (Colman *et al.* 1997). L'ATP libéré par les cellules lésées active les polynucléaires neutrophiles qui s'accumulent et dégranulent au niveau du site de blessure (O'Flaherty *et al.* 1994). Ils libèrent des cytokines (IL-1, IL-6 et TNF α) responsables aussi de l'augmentation de la douleur (Cook *et al.* 2002). La sérotonine et de l'histamine libérées par les plaquettes et les mastocytes sont également impliquées dans l'exacerbation de la douleur et elles augmentent la perméabilité des vaisseaux. De nombreuses molécules interagissent pour générer la douleur qui accompagne l'inflammation (Millan 1999). Les insectes possèdent au sein de leur salive des composés capables d'inhiber la sensation de douleur perçue par l'hôte provoquée par la piqûre. La salive de *Triatoma infestans* inhibe l'activité des canaux à sodium au niveau des nerfs (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). 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).

4.1.5 - Les protéines de la Famille D7: à l'interface des réponses de l'homme

De nombreux insectes hématophages possèdent des protéines salivaires appartenant à la famille des protéines D7 (Arca *et al.* 2002; Valenzuela *et al.* 2002). Chez les moustiques, 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). *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 (Campbell *et al.* 2005; Valenzuela *et al.* 2002). *Aedes aegypti* et *A. albopictus* possèdent 4 formes courtes et 2 de forme longue (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'hémostase et de l'inflammation (Arca *et al.* 2002; Calvo *et al.* 2002; Valenzuela *et al.* 2002); ii) elles seraient 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.* 2006).

Ces protéines chez *Culex spp.* (Malafronte *et al.* 2003) et *aedes* (Mouchet communication personnelle) ont montré des propriétés immunogéniques.

4.2 - Modulation de la réponse immune de l'hôte

L'immunomodulation induite par la piqûre et la sécrétion des protéines salivaires des arthropodes vecteurs sera développée dans le chapitre 5 "Relation immunologique homme-vecteur".

4.3 - 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 (Yuval 1992). Chez les moustiques, une α -glucosidase est responsable de la digestion (Grossman *et al.* 1997)(Marinotti *et al.* 1996).

Des lysozymes (Moreira-Ferro *et al.* 1998; Pimentel *et al.* 1990) et des agents bactériolytiques (Rossignol *et al.* 1986) protègent les pièces buccales et la salive des invasions bactériennes. Chez ces vecteurs, des estérases ont également été identifiées (Argentine *et al.* 1995).

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 protéine apyrase présente, en plus de son action anti-plaquettaire, une action sur le comportement alimentaire de l'insecte. Chez l'anophèle et l'aedes, il a été montré que le temps de probing est inversement proportionnel à la quantité d'apyrase (Ribeiro *et al.* 1985).

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 une partie de sa salive qui contient un facteur activateur de gamètes, le GAF (Gamete Activation Factor) (Hirai *et al.* 2001). Ainsi les gamétocytes fraîchement ingérés par l'anophèle sont en contact direct avec le GAF au niveau de l'intestin moyen.

Les glandes salivaires ont elles-mêmes un rôle dans l'infection et donc la transmission des parasites d'un hôte à l'autre. Lors de l'éclatement des hématies, 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 (Rosenberg 1985)(Brennan *et al.* 2000). Les glandes salivaires interviennent également dans la maturation des parasites. Par exemple, l'attachement des trypanosomes *via* leur flagelles aux microvillosités des cellules épithéliales au niveau du lumen des glandes salivaires des glossines est indispensable pour la transformation des parasites en forme métacyclique infectante (Vickerman *et al.* 1988). Les glandes salivaires des anophèles modifient également le pouvoir infectieux des plasmodiums. Un test de résistance à la lyse médiée par le complément de l'hôte vertébré a permis de montrer que 86% des sporozoïtes contenus dans l'estomac sont lysés contre 24% pour ceux ayant été en contact avec les glandes salivaires (Touray *et al.* 1994). D'autres études ont montré que les sporozoïtes ayant séjourné dans les glandes salivaires sont 100 fois plus infectieux que ceux issus des oocystes.

4.4 - Modification de la composition salivaire

La salive des insectes hématophages est un fluide biologique dont la composition dépend du statut physiologique et de l'âge du vecteur. 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 étudié (Marinotti *et al.* 1996). Il apparaît que le sialome (ensemble des transcrits des glandes salivaires) des jeunes anophèles est moins diversifié que celui des plus âgés, 29 protéines ont été détectées chez les jeunes *Anopheles* (8 jours) contre 42 chez les plus âgés (21 jours). 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.* 2006). Cette protéine aurait un rôle de défense, 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. L'apyrase, en plus de son rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, intervient sur le comportement du vecteur (Ribeiro *et al.* 1985). En effet, le temps du repas, celui de la salivation et le nombre de piqûres sont en effet augmentés chez un vecteur infecté ce qui faciliterait la dissémination du pathogène à plusieurs hôtes (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). Une diminution des protéines D7 augmenterait la réaction inflammatoire au site de piqûre. La fonction de la protéine gSG6 n'est pas connue, il est difficile d'anticiper l'effet de la réduction de son expression sur la transmission ou le développement du parasite. Cette modification dans la composition de la salive et dans le comportement d'un vecteur infecté pourrait permettre aux parasites d'augmenter leur transmission chez l'hôte. 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).

4.5 – Apport des techniques de bio-informatique dans l'étude du transcriptome des glandes salivaires d'*An. gambiae* et de *G. morsitans morsitans*

Les progrès techniques dans le domaine de la biologie moléculaire et l'apport du séquençage des génomes d'*An. gambiae* (Holt *et al.* 2002) et de *G. morsitans morsitans* (Aksoy *et al.* 2005) permettent d'étudier la composition des sécrétions salivaires et de développer de nouveaux outils dans la lutte contre la transmission de ces maladies. Ces techniques complémentaires permettent l'identification des protéines salivaires possédant des propriétés pharmacologiques (anti-hémostase, vasodilatation) et immunomodulatrices permettant ainsi l'identification de protéines salivaires candidates pour l'élaboration de vaccins, de marqueurs d'exposition ou utilisables pour les désensibilisations dans un contexte allergique.

Différentes études explorant les protéomes et les transcriptomes des glandes salivaires des insectes vecteurs ont permis d'identifier et de caractériser les différents gènes ou transcrits présents à ce niveau (le sialome) (Arca *et al.* 1999; Francischetti *et al.* 2002). Les méthodes basées sur le séquençage aléatoire de clones dérivés de banque d'ADNc des glandes salivaires utilisées sont présentées dans la figure 32 (Valenzuela 2002). D'autres techniques peuvent être utilisées dont l'analyse protéomique des glandes salivaires 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 (Kalume *et al.* 2005). Ces études permettent d'établir des catalogues d'ADNc/protéines et de décrire leurs caractéristiques.

Les outils de 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. 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.

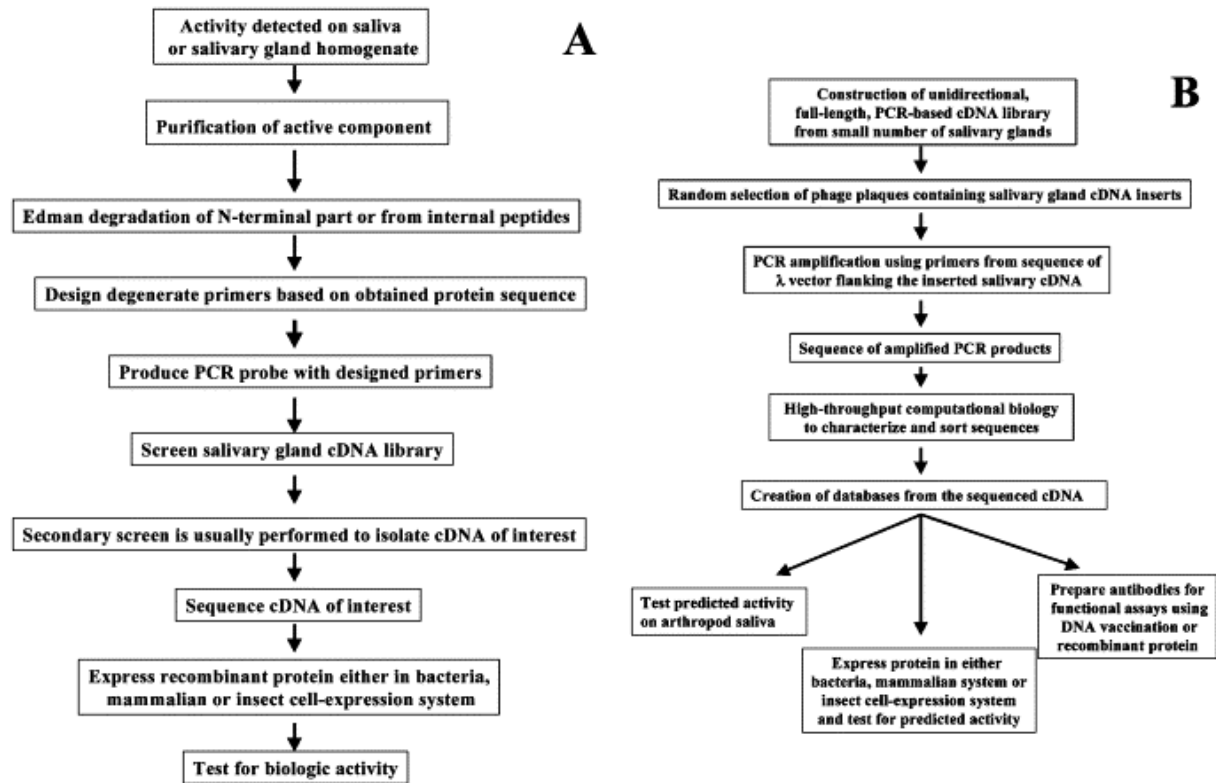


Figure 32. Protocoles (A) et stratégies (B) utilisés pour isoler et caractériser les protéines ou les ADNc salivaires des insectes vecteurs.
D'après (Valenzuela 2002).

Description du sialome d'*An. gambiae*

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*, *An. stephensi*, *An. funestus* et *An. gambiae* (Arca *et al.* 2005; Calvo *et al.* 2004; Calvo *et al.* 2007; Valenzuela *et al.* 2003).

Des différences de composition ont été observées entre les mâles et les femelles (Calvo *et al.* 2006). 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 deux sexes mais avec un enrichissement chez les femelles (gSG5, gSG6, gVAG et Ag5).

Les prédictions ont permis d'identifier 72 protéines exprimées au niveau des glandes salivaires d'*An. gambiae*, la majorité intervenant dans le repas sanguin, et pour une dizaine d'entre elles une fonction leur a été assignée (Arca *et al.* 2005).

La majorité des gènes codant pour des protéines non sécrétées permettent de faire fonctionner la machinerie cellulaire et interviennent 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. D'autres transcrits codent pour les composants de la matrice extra cellulaire, des facteurs de transcription.

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

- ☞ Des protéines de la famille des D7 protéines (3 de forme longue, 4 de forme courte et 1 régulateur d'expression),
- ☞ 4 gènes codant pour des membres de la famille de l'antigène 5,
- ☞ Des protéines de la famille des Salivary Gland (SG),
- ☞ Des mucines,
- ☞ Des enzymes telles que i) les médiateurs de l'inflammation ou intervenant dans le catabolisme de l'hémostase (5' nucléotidase, apyrase, peroxydase, une epoxy hydrolase, ii) enzymes digérant les sucres (amylase et α -glucosidase), iii) des protéases (sérine protéase, metalloprotéases), iiiii) peroxinectine,
- ☞ Des produits relatifs à l'immunité : des lysozymes, 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.* 2005).

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 ressort que les protéines salivaires ubiquitaires interviennent dans la prise du repas sanguin, on retrouve 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 et SG7, le peptide SG6, le peptide Anophelin, les familles 8.2-kDa, 6.2-kDa et les familles hypothétiques 13, 15/17.

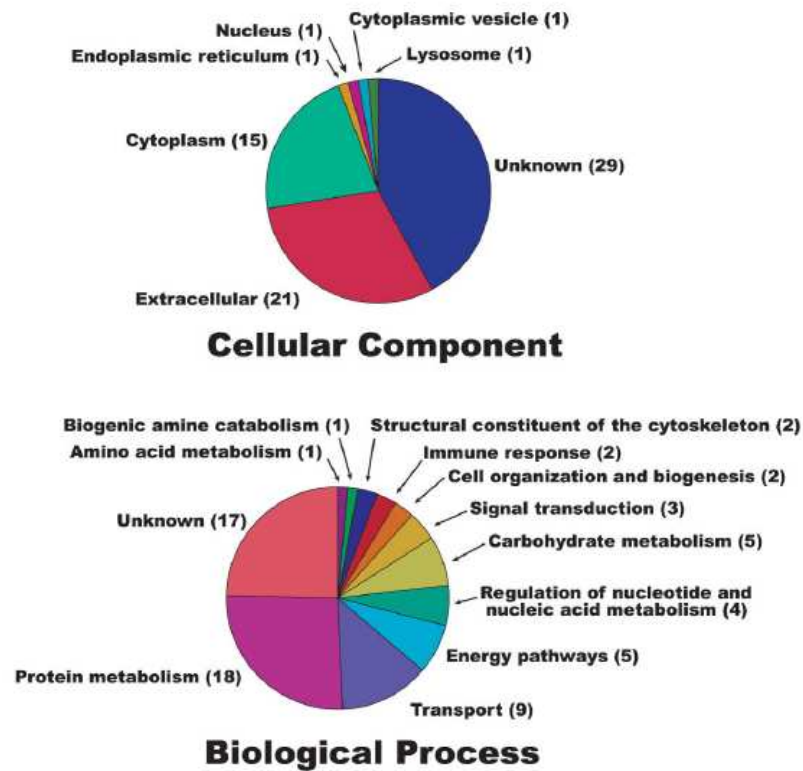


Figure 33. Répartition des protéines des glandes salivaires d'*An. gambiae* en fonction de leur localisation cellulaire (A) et de leur fonction biologique (B).
D'après (Kalume *et al.* 2005).

Description du sialome de *Glossina spp.*

La composition salivaire des glossines a été considérablement moins étudiée que celle des anophèles. Seules une dizaine de protéines ont été détectées dont quatre majeures (Li *et al.* 2001). On retrouve deux protéines impliquées dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Mant *et al.* 1981) et un inhibiteur de thrombine, le Tsétsé Thrombine Inhibitor (TTI, ~ 3.5 kDa) (Cappello *et al.* 1998). D'autres protéines salivaires ont été caractérisées au niveau moléculaire ; les Tsetse Salivary Growth Factor -1 et -2 (TSGF, ~ 53 kDa) sont des protéines ayant un rôle dans la vasodilatation et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Li *et al.* 2000); Tsal-1 et -2 (~ 43 kDa) n'ont pas de fonction connue mais leurs séquences présentent des similitudes avec des protéines salivaires de *C. quinquefasciatus* ayant une activité endonucléase (Calvo *et al.* 2006). Ces protéines représentent plus de 40% du contenu total des glandes salivaires (Van Den Abbeele *et al.* 2007).

Le TAG5 (~ 28kDa) qui est une des protéines responsables du développement d'une réaction d'hypersensibilité de type 1 ou des réactions allergiques sévères observées après inoculation de salive de glossine (Ellis *et al.* 1986; Stevens *et al.* 1996).

Récemment trois gènes codant pour de nouvelles protéines salivaires sécrétées ont été nouvellement identifiés : *Glossina morsitans morsitans* salivary gland protein -1, -2 et -3 (Gmmmsgp -1,-2 et -3) (Van Den Abbeele *et al.* 2007).

Chez les glossines, les mâles et les femelles sont hématophages, néanmoins une différence de composition salivaire a été observée. Les mâles expriment un plus fort taux de Tag5 et de Tsal-2 (Li *et al.* 2001). Des variations d'expression entre espèces (*G. m. morsitans*, *G. austeni* et *G. fuscipes*) ont également été rapportées. *G. m.morsitans* présenterait un plus fort taux de protéines Tsal-2 que les deux autres espèces, alors que des niveaux comparables de TTI et de Tsal-1 ont été observés entre les trois espèces (Li *et al.* 2001).

La majorité des gènes identifiés codent des protéines dont la fonction reste inconnue. La grande complexité des glandes salivaires laisse penser que de nouvelles activités peuvent être identifiées et pourraient permettre d'assigner des fonctions physiologiques à ces protéines.

Chapitre 5

Relation immunologique homme-vecteur

L'effraction du derme et des vaisseaux sanguins par les pièces buccales des insectes, ainsi que la sécrétion de protéines salivaires par le vecteur induisent une réponse immunitaire de la part de l'homme. La salive peut ainsi être responsable d'une immunomodulation locale qui, par un effet adjuvant ou immunosuppresseur, va influencer le développement de la réponse immune innée et adaptative, spécifique et non spécifique, de l'homme. Le développement de cet effet immunomodulateur a ainsi des conséquences sur la transmission des pathogènes et le développement des pathologies associées (Titus *et al.* 2006). Cet effet de la salive semble toucher plusieurs paramètres de l'immunité tels que les cellules présentatrices d'antigène (CPA), des cytokines, des lymphocytes T (LT) et B (LB) et le complément (voie classique et voie alternative). La durée contact homme-vecteur (tiques plusieurs jours et moustiques quelques minutes) ainsi que la manière de prélever le sang (telmophagie/solénophagie) influencent les effets immunomodulateurs induits par la salive de ces vecteurs. Les effets immunomodulateurs dépendent donc du système homme-vecteur impliqué. En plus de cette influence immunomodulatrice sur l'immunité innée et adaptative, certaines protéines salivaires ont des propriétés immunogéniques qui vont ainsi induire une synthèse d'Ac spécifiques qui sont dirigés spécifiquement contre ces protéines (IgM, IgE et IgG, (Brossard *et al.* 1979). Ceci est notamment observé par le développement de réactions allergiques (réactions cutanées et hypersensibilités) consécutives à la piqûre de moustiques (Peng *et al.* 2004). La composition isotypique de cette réponse anticorps spécifique aux protéines salivaires peut être modifiée dans le temps. Plusieurs facteurs tels que les antécédents d'exposition, l'intensité d'exposition et la physiologie de l'hôte peuvent influencer le développement de la réponse immune anti-salive.

L'étude des protéines salivaires et de leurs effets immunomodulateurs sur la réponse immune de l'homme représente une voie de recherche qui permet de mieux caractériser les mécanismes de transmission des pathogènes et de la relation homme-vecteur dans l'optique d'un contrôle plus efficace des maladies à transmission vectorielle. L'étude des réponses Ac spécifiques aux protéines salivaires pourrait être une voie de développement de nouvelles stratégies vaccinales contre la transmission des pathogènes du vecteur à l'homme. Mais en parallèle, l'évaluation qualitative et quantitative de cette réponse Ac spécifique pourrait aboutir au développement de nouveaux bio-indicateurs mesurant le niveau d'exposition des populations et des individus aux piqûres des insectes vecteurs et ainsi évaluant le risque de transmission des pathogènes.

Les études évaluant les effets de la salive des vecteurs sur la réponse immune de l'hôte sont relativement récentes (Bissonnette *et al.* 1993; Cross *et al.* 1994). Les données les plus

avancées et les plus complètes concernent l'influence de la piqûre de *Lutzomia longipalpis* et de *Phlebotomus papatasi* sur l'immunomodulation locale et sur la transmission de *Leishmania major* dans des modèles animaux expérimentaux (Theodos *et al.* 1991). Ce modèle expérimental murin a été largement étudié car la pathologie induite est cutanée, facilement quantifiable et la réponse immune associée semble clairement définie.

5.1 - Immunomodulation par la salive : de la réponse immune innée à l'adaptative. Conséquences sur la transmission des pathogènes?

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 *et al.* 1996). En effet des milliers voire des millions de parasites doivent être injectés par la seringue pour induire expérimentalement une infection chez la souris. De plus, il a été observé que la charge parasitaire, la taille des lésions et le degré de la pathologie sont moins importants après une inoculation par la seringue comparativement aux effets observés lors d'une co-injection du même nombre de parasites en présence de la salive de phlébotomes (Titus *et al.* 1988). Ces deux observations suggèrent que la salive des phlébotomes semble nécessaire au développement de la pathologie et ceci par son effet immunomodulateur sur la réponse immune de l'homme. 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.* 1991). Ainsi, la salive des phlébotomes *Lutzomia* et *Phlebotomus* module la RI innée et adaptative de l'hôte. Dans certains modèles expérimentaux, il a été mis en évidence un effet régulateur sur la production de cytokines de type Th1 et Th2 de la part de la salive de ces vecteurs, jouant ainsi un rôle clé dans la protection/susceptibilité à l'infection (Kamhawi 2000). En effet, une étroite relation a été établie entre les réponses immunes de type Th1 ou Th2 et la sévérité de la pathologie. Dans le modèle de la leishmaniose expérimentale, la réponse de type Th1 est une réponse immune protectrice tandis que la réponse de type Th2 est associée avec l'infection du parasite et la pathologie de la leishmaniose.

Les extraits salivaires totaux de phlébotomes injectés au même moment que les parasites inhibent la réponse immunitaire de type Th1 par une inactivation de la prolifération des lymphocytes T et une baisse de production des cytokines associées, l'interleukine (IL) 12 et l'interferon- γ (IFN- γ) (Mbow *et al.* 1998). De nombreux travaux sur l'influence

immunomodulatrice de la salive ont débouché sur l'identification du Maxadilan (MAX), le principal vasodilatateur de *L. longipalpis*. Des études ont montré que ce petit peptide de 7 kDa est capable d'induire le même effet immunomodulateur que des extraits salivaires totaux en favorisant l'immunité vers une réponse de type Th2 (Rogers *et al.* 2003). L'administration locale de MAX induit des érythèmes cutanés et inhibe l'activation des LT (Qureshi *et al.* 1996). La cible préférentielle du MAX est le macrophage, cellule hôte des leishmanies (Theodos *et al.* 1993). Il peut inhiber la production de substances ayant une action anti-parasitaire telles que le NO (Hall *et al.* 1995; Waitumbi *et al.* 1998) l' H_2O_2 et le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) par les macrophages (Bissonnette *et al.* 1993).

Les mécanismes immunologiques semblent néanmoins être dépendants du complexe pathogène étudié. En effet, la salive de *P. papatasi* présente des effets immunomodulateurs similaires de ceux de *L. longipalpis* mais deux importantes différences ont été observées entre la salive de ces deux vecteurs: 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 . L'IL-4 stimule la différenciation des cellules de types Th2 et supprime le développement des cellules de type Th1 afin de prévenir le développement d'une réponse inflammatoire (Rohousova *et al.* 2006).

La salive des moustiques a également une influence sur le développement de la pathologie, la co-injection de virus Cache-Valley ou de *Plasmodium berghei* avec de salive de moustiques exacerbe la pathologie et facilite la transmission (Edwards *et al.* 1998; Schneider *et al.* 2006; Vaughan *et al.* 1999).

Un effet des protéines salivaires sur les réponses immunes innée et adaptative a également été observé chez les tiques. Leur 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 1987). Une des particularités des piqûres de tiques est que ces arthropodes restent au contact de leur hôte pendant des semaines. Ainsi, un grand répertoire d'activités immunomodulatrices a été décrit comprenant l'induction de la réponse de type Th2 avec une inhibition de la réponse pro-inflammatoire et des cytokines de type 1 (Kopecky *et al.* 1999; Kovar *et al.* 2001; Mejri *et al.* 2001), l'inhibition des CPA (Kuthejlova *et al.* 2001; Urioste *et al.* 1994), la modulation des LT et des LB (Hannier *et al.* 2004). 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).

La salive des simules présente également des propriétés immunosuppressives sur l'activité des cellules T. Leurs piqûres inhibent la capacité de présenter les antigènes par les cellules immunes en diminuant l'expression des molécules du CMH de type II (Cross *et al.* 1993). Ainsi, il est possible que la salive module la capacité du système immunitaire de l'hôte à répondre à un antigène "étranger".

L'effet de la salive de différents arthropodes hématophages sur le développement de la réponse immune innée et adaptative de l'hôte est résumé dans la figure 34.

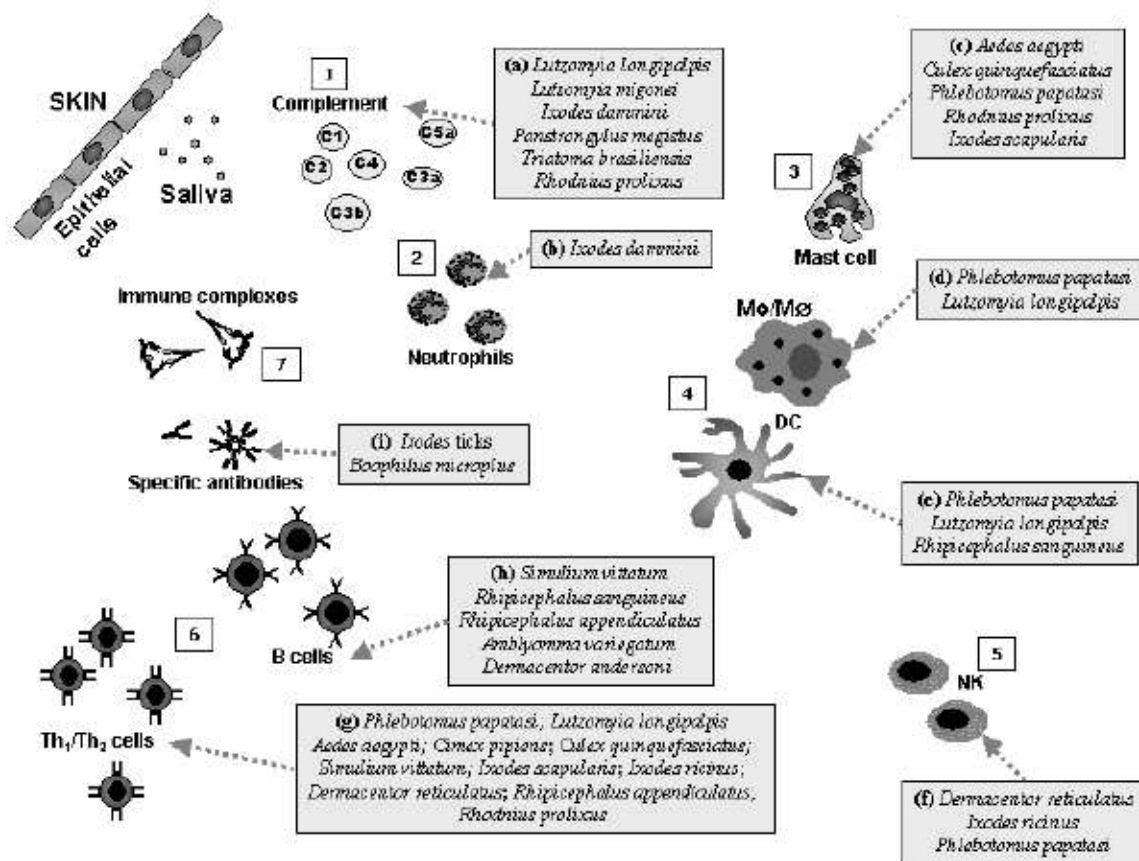


Figure 34. Effet immunomodulateur de la salive d'arthropodes hématophages sur la réponse immune innée et adaptative de l'homme.
D'après (Andrade *et al.* 2005).

1- Le complément : inhibition de la voie classique et alternative du complément avec inhibition du relargage d'amine vasoactive et de l'activation des LB et LT ; 2- inhibition des fonctions des neutrophiles ; 3-réduction de la dégranulation des mastocytes et du relargage des médiateurs de l'inflammation ; 4- inhibition de l'activation des macrophages et réduction de la différenciation, maturation et de la production de cytokines par les cellules dendritiques ; 5- réduction de la cytotoxicité des cellules NK ; 6- inhibition de la prolifération des cellules LB et LT, modulation de la production des Ig par les LB et modulation de la production des cytokines par les LT ; 7- modification des réponses Ig.

5.2 - Une immunomodulation différente entre vecteurs?

Comme indiqué précédemment pour les phlébotomes du « nouveau monde » (*L. longipalpis*) et de « l'ancien monde » (*P. papatasi*), des espèces proches phylogénétiquement peuvent avoir développé des stratégies différentes pour moduler la réponse immune de l'hôte. 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, pour les moustiques, il a récemment été démontré chez les souris, que la salive de deux espèces de culicidés diffèrent dans leur activité d'immunomodulation (Wanasen *et al.* 2004). Les extraits salivaires totaux d'*Aedes* inhibent la prolifération des LT et la production de cytokines de type Th1 et Th2 après stimulation antigénique spécifique (ovalbumine) ou non spécifique (mitogène). Cet effet n'a pas été retrouvé avec les extraits salivaires de *Culex quinquefasciatus*. Un effet immunosuppresseur au niveau du site de piqûre peut être obtenu par l'inoculation de sialokinine d'*Aedes*. Cette protéine régule positivement la production d'IL4 et d'IL10 orientant la réponse immune vers le type Th2, modifie l'activation des macrophages et augmente la mortalité des LT (Zeidner *et al.* 1999). Chez *Anopheles*, la salive favoriserait le développement d'une réponse de type TH1 avec une augmentation d'IFN γ (Donovan *et al.* 2007).

5.3 - Influence de la salive sur la réponse immune anti-pathogène

A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées au pouvoir immunomodulateur de la salive d'arthropodes (tiques, glossines, moustiques...) sur le développement et l'orientation de la réponse immune spécifique aux pathogènes transmis lors d'une piqûre infectante dans un contexte homologue (ex: *Anopheles* et *Plasmodium* ou *Aedes* et arboviroses). En revanche, dans un contexte hétérologue (*Anopheles* et pathogènes non transmis par ce vecteur = pathogène irrelevant) 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 *et al.* 1998). Des observations similaires concernant les LB ont été faites. Une production d'Ac anti-tique est observée chez un modèle murin après une infection. 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 utilisée ici comme antigène irrelevant (Bovine Serum Albumine) co-injectée chez l'hôte (Fivaz 1989). Par ailleurs, dans des modèles murins, la co-injection d'ovalbumine chez des souris en présence de salive de glossine inhibe la réponse IgG spécifique à l'ovalbumine, suggérant que la salive des glossines a un effet supprimeur sur les réponses des LB et LT spécifiques aux antigènes hétérologues (Caljon *et al.* 2006).

Une théorie développée par M. Coluzzi au cours d'une étude récente suggère que l'immunomodulation locale induite par la salive de moustiques *Anopheles* pourrait favoriser la transmission du virus Human Herpes Virus 8, l'agent pathogène responsable du sarcome de Kaposi. Le virus est transmis essentiellement par la salive humaine (Coluzzi *et al.* 2004). Cette hypothèse fait suite à l'observation épidémiologique que la réduction des cas d'HHV8 était corrélée avec la réduction des populations de vecteurs en Italie (Coluzzi *et al.* 2003). 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).

Par ailleurs, il a été remarqué une différence de réponse IgG anti-*Plasmodium* chez des enfants entre deux villages présentant des expositions différentes aux *Anopheles*. En effet, les vecteurs principaux appartenaient à deux espèces différentes d'*Anopheles* (*An. gambiae* et *An. funestus*) et l'intensité d'exposition aux piqûres de ces vecteurs était différente selon les villages. Un des villages présentait une forte exposition à *An. gambiae* et l'autre une faible exposition à *An. funestus*. Les auteurs ont suggéré que, en plus de l'intensité d'exposition, la nature des piqûres (*An. gambiae* ou *An. funestus*) pourrait influencer la réponse Ac contre les pathogènes (Sarr *et al.* 2007).

5.4 - Effet d'une pré-exposition répétée aux antigènes salivaires des vecteurs sur le développement de l'infection

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. En effet, la pré-exposition aux antigènes salivaires (injection d'extraits salivaires ou exposition aux piqûres)

des phlébotomes semble induire une augmentation d'IFN γ et semble protéger de l'infection (Belkaid *et al.* 1998; Kamhawi *et al.* 2000; Valenzuela *et al.* 2001). Ces observations suggèrent la possibilité intéressante que la vaccination de l'hôte contre des composants salivaires des vecteurs pourrait inhiber la transmission des leishmanies. 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 dans ce cas exacerbe la pathologie.

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 à la transmission de *Borrelia burgdorferi* (Wikel *et al.* 1997).

A l'inverse, une récente étude a montré que la pré-exposition de souris à la piqûre 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 opposé à l'effet protecteur induit par la réaction inflammatoire développée au site de piqûre suite à des expositions répétées aux phlébotomes et aux tiques (Belkaid *et al.* 1998). Ce résultat contradictoire pourrait être expliqué par la différence de nature des pathogènes (protozoaires/bactéries versus virus).

Néanmoins, cela souligne que la pré-exposition aux antigènes salivaires induirait un micro-environnement particulier qui serait favorable ou non à la transmission des pathogènes par un effet immunomodulateur au 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.

5.5 - Propriétés immunomodulatrices de la salive des glossines et des anophèles

La connaissance des aspects immunologiques de la salive des glossines est très limitée. Des réactions d'hypersensibilités immédiate et retardée ont été observées chez des lapins exposés aux piqûres de glossine (Ellis *et al.* 1986). Les lapins peuvent également développer une réponse humorale contre certains composants salivaires (Matha *et al.* 1988). Des travaux récents ont démontré que la salive de glossine orientait, chez la souris, la réponse immunitaire vers le type Th2 et induisait la synthèse d'Ac (IgG1 et IgE) spécifiques aux composés salivaires totaux (Caljon *et al.* 2006). Des pré-expositions répétées aux piqûres de

glossines induiraient un micro-environnement favorable au développement des trypanosomes (Akol *et al.* 1982). Ces résultats sont eux aussi contradictoires avec ceux observés lors de la transmission des leishmanies où les réactions d'hypersensibilités retardées inhibaient l'infection (Kamhawi *et al.* 2000; Valenzuela *et al.* 2001). Le caractère extracellulaire des trypanosomes pourraient les rendre moins sensibles au phénomène d'hypersensibilité locale et leur permettrait de quitter plus rapidement le site de piqûre (Naessens *et al.* 2003).

Concernant l'immunologie de la salive des *Anopheles*, peu de travaux ont été réalisés. Ohashi *et al.* ont identifié un facteur, le Neutrophil Chemotactic Factor, présentant une activité attractive pour les neutrophiles mais non pour les éosinophiles, (Ohashi *et al.* 2001). Il pourrait être impliqué dans la réaction inflammatoire locale par le recrutement et l'activation de neutrophiles au niveau du site de piqûre. Le NCF pourrait de ce fait avoir une orientation sur la balance Th1/Th2 car les neutrophiles sont les principales sources de production d'IL12 et d'IL10 (Romani *et al.* 1997). Une étude récente a montré que la pré-exposition de souris aux piqûres non infectantes d'*An. stephensi* influençait la réponse immune locale et systémique vers un type Th1 (augmentation d'IL 12 et IFN γ) et limitait le développement de *P. yoelii* chez l'hôte (Donovan *et al.* 2007).

5.6 - Approche vaccinale

La résistance croissante des vecteurs aux insecticides et des pathogènes aux molécules actives utilisées dans les traitements souligne le besoin urgent de développer de nouvelles stratégies afin de mieux contrôler la transmission des maladies vectorielles. La biologie complexe du parasite, dominée par leur variabilité antigénique et la faible immunogénicité des antigènes rend l'élaboration des vaccins anti-parasite assez complexe. Comme il a été développé dans le chapitre "2.3.1 – Vaccins", la mise au point de vaccin dirigé contre le vecteur est une voie alternative 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. Mais l'observation de l'immunomodulation induite au site de piqûre par la salive des vecteurs et son effet potentiel sur la transmission et le développement des pathogènes suggère qu'il serait possible de contrôler la transmission des parasites par une vaccination de l'hôte par des composés salivaires immunogéniques (Titus *et al.* 2006).

Une voie attractive concerne les vaccins bloquant la transmission des parasites en stimulant la réponse immune contre le vecteur. Les phénomènes immunologiques liés à cet effet anti-piqûre pourraient impliquer à la fois la réponse anti-salive humorale et cellulaire. La neutralisation d'un ou plusieurs composés salivaires intervenant dans l'inhibition des réponses de l'homme (hémostatique et inflammatoire) ne permettrait plus le succès du repas sanguin et de la piqûre ce qui pourrait réduire la transmission des pathogènes. Par exemple, les Ac spécifiques 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. 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 de cette protéine (Mathews *et al.* 1996). De même, des Ac anti-MAX développés suite à une immunisation par le MAX sous une forme recombinante, peuvent inhiber ses fonctions vasodilatatrices et ainsi avoir un impact négatif sur le succès du repas sanguin. Ces effets semblent spécifiques de *L. longipalpis* car ces Ac n'ont pas d'influence sur le repas sanguin de *P. papatasi* (Milleron *et al.* 2004). D'autre part, une forte réponse cellulaire anti-salive 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 (Mbow *et al.* 1998)(Lima *et al.* 1996). De plus, des Ac spécifiques aux glandes salivaires des moustiques, réingérés au moment du repas sanguin, peuvent traverser la paroi de l'intestin moyen (perméabilité), rejoindre les glandes salivaires et bloquer l'invasion des glandes salivaires par les pathogènes (Barreau *et al.* 1995; Brennan *et al.* 2000).

Le second mécanisme de protection qui pourrait agir de concert avec le premier 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 contre le parasite (exemple *L. longipalpalis*), comme cela a été développé dans le chapitre précédent "5.3 - Influence de la salive sur la réponse immune anti-pathogène".

Ainsi, dans un modèle expérimental, la co-injection d'extraits de glandes salivaires de phlébotome avec les parasites *L. major* pouvait exacerber la pathologie en orientant la réponse vers le type Th2. Cet effet peut être complètement annihilé par la pré-exposition de l'hôte aux extraits de glandes salivaires du vecteur induisant une forte réaction d'hypersensibilité retardée au site de piqûre (Belkaid *et al.* 1998). Ce même phénomène protecteur peut être également retrouvé après pré-exposition avec des piqûres non infectantes, du à une

augmentation des cytokines responsables de l'immunité à médiation cellulaire (Kamhawi *et al.* 2000). En effet, la pré-exposition "salivaire" induit une réponse immune protectrice locale (Th1) et permet ainsi une réduction des lésions et une diminution de la charge parasitaire au site de la piqûre. Dans ce contexte, le peptide vasodilatateur MAX avec des propriétés anti-inflammatoires et PpSP15, un suppresseur de l'activation des LT, ont été identifiés comme des candidats vaccinaux potentiels bloquant la transmission des pathogènes après immunisation. En effet les souris vaccinées par le MAX de *L. longipalpis* (Morris *et al.* 2001) ou avec la protéine SP15 de *P. papatasi* (Anguita *et al.* 2002; Valenzuela *et al.* 2001) présentaient des lésions plus petites et seraient réfractaires à l'infection.

Vers un vaccin pour l'homme

Bien que tous les vecteurs, par leur mode de piqûre, ne peuvent pas être strictement comparables à ceux de la leishmaniose ou aux tiques, ces précédents travaux suggèrent néanmoins que l'élaboration d'un vaccin utilisant des protéines salivaires d'arthropodes 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 anti-transmission est que les populations vivant en zone de transmission sont exposées aux piqûres des vecteurs (non infectante à grande majorité) pendant toute la saison de transmission, qu'elle soit saisonnière ou pérenne. Ce " boost immunitaire " naturel par la piqûre non infectante favoriserait ainsi l'établissement d'une réponse protectrice robuste et durable. Par exemple, dans le cas du paludisme et des leishmanioses, les populations vivant en régions endémiques, et plus particulièrement les adultes, montrent souvent une forme atténuée de l'infection palustre ou une faible parasitémie alors que les nouveaux arrivants ou les enfants sont plus souvent sujets aux formes graves. 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 *et al.* 2004). La reproduction et le maintien d'une telle immunité par une immunisation par des composés salivaires pourraient participer à diminuer la morbidité de ces parasitoses. De tels vaccins pourraient être administrés chez les jeunes enfants qui n'ont pas encore développé d'immunité anti-vecteur dans des contextes naturels. De tels vaccins pourraient également être appliqués aux voyageurs. Mais on a remarqué un polymorphisme dans les séquences de certaines protéines salivaires chez des mêmes insectes provenant de régions géographiques différentes, cela a été mis en évidence pour le MAX (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 l'utilisation d'au moins deux protéines salivaires permettraient 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.

5.7 - Réactions allergiques

Les principaux travaux concernant le rôle immunologique de la salive des moustiques avaient pour objectif de caractériser les réactions allergiques et d'hypersensibilités liées à l'influence des protéines salivaires sécrétées pendant la piqure. Ces études, principalement menées au Canada et en Finlande, ont porté sur l'hypersensibilité des individus à *Aedes* et *Culex*. 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.* 1997)(Jeon *et al.* 2001; Peng *et al.* 1995). Des protéines salivaires de moustiques (*Anopheles*, *Aedes* et *Culex*) d'un poids moléculaire compris entre 15 à 100 kDA présentent des propriétés antigéniques (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997; Peng *et al.* 1998). Certaines sont communes aux différentes espèces de moustiques alors que d'autres sont spécifiques à une espèce (Volf *et al.* 2001). Ces protéines peuvent être ainsi utilisées, sous forme recombinante, en diagnostic (exposition aux piqûres allergisantes) ou en immunothérapie, permettant une désensibilisation de l'homme (Remoue *et al.* 2005). Ces travaux sont les premiers à souligner la spécificité de certaines protéines salivaires à une espèce (*Aedes aegypti* versus *Aedes albopictus* par exemple) mais aussi certains antigènes spécifiques du genre de moustique (*Aedes*, *Culex*, *Anopheles*...) ou communs aux différents genres.

5.8 - Marqueur immunologique d'exposition aux piqûres des vecteurs

L'étude des relations immunologiques homme-vecteur par l'analyse de la réponse Ac spécifique aux protéines salivaires peut également permettre d'identifier des marqueurs immuno-épidémiologiques évaluant le niveau d'exposition des populations aux piqûres des vecteurs et de ce fait aux risques de transmission des maladies à transmission vectorielle.

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. L'étude qualitative et quantitative de cette réponse Ac en fonction des contextes d'exposition des populations (intensité et périodicité) pourrait permettre de développer des marqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition aux risques de piqûres des insectes vecteurs, méthodes alternatives et complémentaires aux captures entomologiques qui sont actuellement les méthodes de référence pour l'évaluation de l'exposition.

Le premier exemple d'un tel indicateur immuno-épidémiologique a été montré aux USA chez des individus infectés par *Borrelia burgdorferi*, l'agent responsable de la maladie de Lyme: le taux d'Ac IgG spécifiques à la salive d'*Ixodes damini* était corrélé avec celui des Ac anti-bactérie et était supérieur chez des individus infectés par *B. burgdorferi* (Schwartz *et al.* 1990). Plus récemment, cette association a été confirmée dans d'autres sites géographiques où le taux d'Ac IgG anti-salive était plus élevé chez des personnes à haut risque de développer la maladie de Lyme (Lane *et al.* 1999). Ceci suggérerait que l'évaluation de la réponse anticorps anti-salive pourrait permettre d'étudier l'émergence de l'infection. Dans les pays tropicaux, les Ac IgG et IgE anti-salive de *C. quinquefasciatus* ont été détectés chez des individus vivant dans des régions endémiques pour *Wuchereria bancrofti* (Das *et al.* 1991). Les patients atteints de la maladie de Chagas et des individus vivant dans des régions infestées par les triatomes développent une plus forte réponse IgG1 et IgG4 à la salive de triatomes comparés aux individus vivant dans des zones indemnes de ces vecteurs (Nascimento *et al.* 2001). Il a été également suggéré que la réponse Ac aux protéines salivaires de *L. longipalpis* pourrait être un marqueur d'exposition au risque de transmission des leishmanioses (Barral *et al.* 2000).

Concernant les moustiques, des réponses IgG4 et IgE ont été mises en évidence chez l'homme exposé aux piqûres de ces moustiques *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* (Peng *et al.* 1998). De manière intéressante, ces études ont montré que certaines protéines immunogéniques (faible poids moléculaire) seraient spécifiques à une espèce alors que d'autres semblent communes à ces différents moustiques. (Jeon *et al.* 2001; Penneys *et al.* 1989).

Concernant les *Aedes*, une réponse IgE et IgG4 a été détectée pour trois antigènes majeurs de la salive de ces vecteurs (Reunala *et al.* 1994). Une récente étude immuno-épidémiologique au Sénégal a montré que ces réponses Ac 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) comme précédemment indiqué dans une autre étude (Palosuo *et al.* 1997). L'apparition d'une réponse IgE et IgG4 anti-salive pourrait apparaître comme un indicateur d'exposition intense aux piqûres d'*Aedes*. Ce marqueur immunologique semblerait

également apprécier l'hétérogénéité d'exposition en fonction des villages (Remoue *et al.* 2007).

Récemment, dans notre groupe, des études sur la réponse Ac anti-salive ont été décrites pour *An. gambiae*. Les enfants vivant en zone d'endémie pour le paludisme 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. 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. 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, 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. vivax* présentaient un plus fort taux d'IgG anti-salive que des individus vivant hors zone d'endémie (Waitayakul *et al.* 2006). La réponse Ac IgG spécifique de la salive d'*An. gambiae* pourrait ainsi représenter un marqueur immunologique d'exposition aux piqûres de ces vecteurs et de ce fait au risque de transmission des *Plasmodiums*.

On remarquait, dans l'étude au Sénégal, une grande hétérogénéité inter-individu dans le niveau de réponse des Ac anti-salive, des facteurs épidémiologiques inter-humain (génétique, co-infection par des pathogènes) et des différences de niveau d'exposition au sein des mêmes villages pourraient expliquer ces observations. 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 retrouvées (175, 115, 72 et 30 kDa). Par ailleurs, les différences inter-individu 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. Une dernière étude indique que la réponse anticorps IgG spécifique à la salive des *Anopheles* peut également être utile dans l'évaluation de l'exposition de voyageurs (militaires) (Orlandi-Pradines *et al.* 2007). La réponse Ac spécifique aux piqûres d'*An. gambiae* semblait transitoire car elle pouvait diminuer dans les 3 mois suivant l'arrêt de l'exposition.

Concernant l'exposition aux piqûres des mouches tsétsé, *Penchenier et al.* ont recherché un indicateur épidémiologique du contact homme/glossine par la mise en évidence d'Ac dans les sérums humains provenant de régions endémiques contre des broyats de glandes salivaires de glossines (*Penchenier et al.* 1984). En 1984, les techniques immunologiques employées (immuno-diffusion et immuno-électro-diffusion) n'ont pas permis de mettre en évidence une réaction immunologique à la salive. Le développement récent des techniques de biologie moléculaire et d'immunologie pourrait permettre une meilleure connaissance de la réponse immune de l'homme à la piqûre des glossines et permettre une meilleure évaluation de l'exposition au vecteur et son rôle dans la transmission vectorielle. De très récents travaux ont cependant identifié les protéines immunogéniques Tsal-1 et -2 comme des candidats potentiels marqueur 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 en Ouganda aux piqûres de ces insectes.

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 1

*Vers l'identification d'un marqueur immuno-
épidémiologique d'exposition aux piqûres de
Glossina spp.*



Dessin M. Launois, CIRAD

Cette première étude concerne le développement d'un marqueur immunologique d'exposition aux piqûres de glossine, les vecteurs de la THA. Ces travaux ont dans un premier temps évalué le potentiel de la réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux de glossine utilisée comme marqueur d'exposition aux piqûres de ces insectes vecteurs. Dans un deuxième temps, nous avons comparé la composition en protéines salivaires immunogéniques de quatre espèces de glossines, vectrices ou non de *T. b. gambiense*, chez des personnes infectées ou non, résidant en zone d'endémie.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec André Garcia et David Courtin de l'IRD-UR010 et Pascal Grébaut de l'IRD-UR177. Les sérums provenant de la zone de Bandundu en République Démocratique du Congo ont été réunis dans le cadre d'une étude de susceptibilité génétique à l'infection de THA par l'équipe d'A. Garcia. Les glossines provenaient de l'élevage de l'IRD-UR177, situé sur le campus CIRAD à Baillarguet, et le recueil des extraits salivaires de glossine a été effectué en collaboration avec Pascal Grébaut.

Lorsque cette étude a été initiée, peu de travaux avaient été préalablement effectués sur la salive des glossines. Des réactions d'hypersensibilités (type 1 et type 2) et la synthèse d'Ac spécifiques aux glandes salivaires avaient été observées chez le lapin (Ellis *et al.* 1986; Matha *et al.* 1988). Chez l'homme, des techniques d'immuno-diffusion avaient permis d'observer des réactions Ag-Ac mais les techniques utilisées à l'époque ne permettaient pas d'identifier les protéines salivaires incriminées (Penchenier *et al.* 1984). Néanmoins, ces travaux soulignaient des propriétés immunomodulatrices de la salive des glossines chez l'homme.

1.1 - Particularités épidémiologiques de la trypanosomiase humaine africaine en République Démocratique du Congo

En RDC, sept régions sont de nos jours en situation d'hyper endémie comme indiqué sur la figure 35. Plus de 200.000 personnes sont infectées par *T. b. gambiense* (Van Nieuwenhove *et al.* 2001) et plus de 12.6 millions de personnes sont exposées au risque de transmission de THA dans ce pays d'Afrique centrale (Simarro *et al.* 2008).

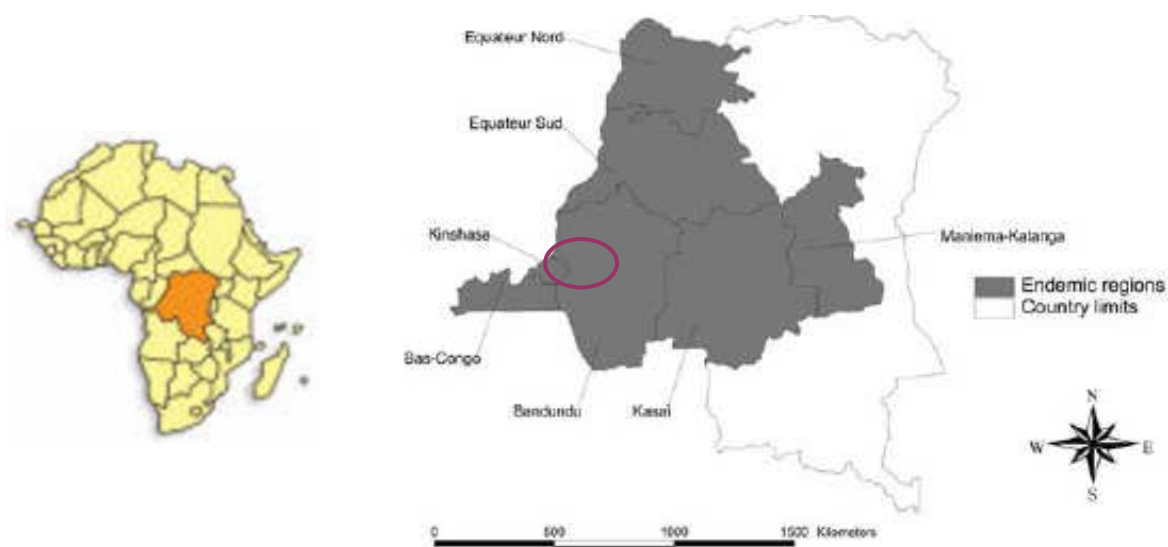


Figure 35. Régions en situation d'hyper endémie en RDC. Les régions présentées sont définies par le PNLTHA, elles ne correspondent pas aux régions administratives. La zone d'étude est indiquée par un cercle rouge. D'après (Lutumba *et al.* 2005).

A l'époque des indépendances, la THA avait été pratiquement éliminée du pays, mais le fléchissement des efforts de lutte et la détérioration des systèmes de santé ont permis la réactivation de certains foyers (Ekwanzala *et al.* 1996). Le diagramme présenté ci-dessous (Figure 36) indique l'évolution du nombre de nouveaux cas de THA recensés au cours du XX^{ème} siècle par le Programme National de Lutte contre la Trypanosomiose Humaine Africaine (PNLTHA). L'augmentation du nombre de cas déclarés ne correspond pas nécessairement à une hausse réelle de la prévalence de la maladie. En effet au regard du caractère actif du dépistage des personnes infectées, les fluctuations de l'aide internationale et du nombre d'équipes mobiles déployées sur le terrain peuvent influencer la déclaration des cas.

En 1992 seulement quatre équipes mobiles sillonnaient le pays, leur nombre augmenta progressivement pour atteindre un effectif d'une trentaine en 1998. Ces équipes ont rapporté plus de 26 000 nouveaux cas sur plus de 1.4 millions de personnes examinées en 1998. À partir de 1996, l'apport de la technique du CATT a considérablement facilité le dépistage actif des populations (Robays *et al.* 2004).

Le nombre de nouveaux cas déclarés a chuté de 32% entre 1997 et 2006 (Simarro *et al.* 2008). Ce déclin n'est pas attribué à un fléchissement dans les activités de dépistage actif car le nombre des équipes mobiles et le nombre de personnes dépistées n'ont cessé d'augmenter,

6% de la population était sous surveillance en 1993 alors qu'en 2003 ce chiffre atteignait 19%. Mais cette diminution de l'incidence n'a pas été observée de façon homogène suivant les régions de RDC. Des cas de THA ont même été recensés au niveau urbain (Simo *et al.* 2006) alors que cette maladie est retrouvée principalement au niveau rural.

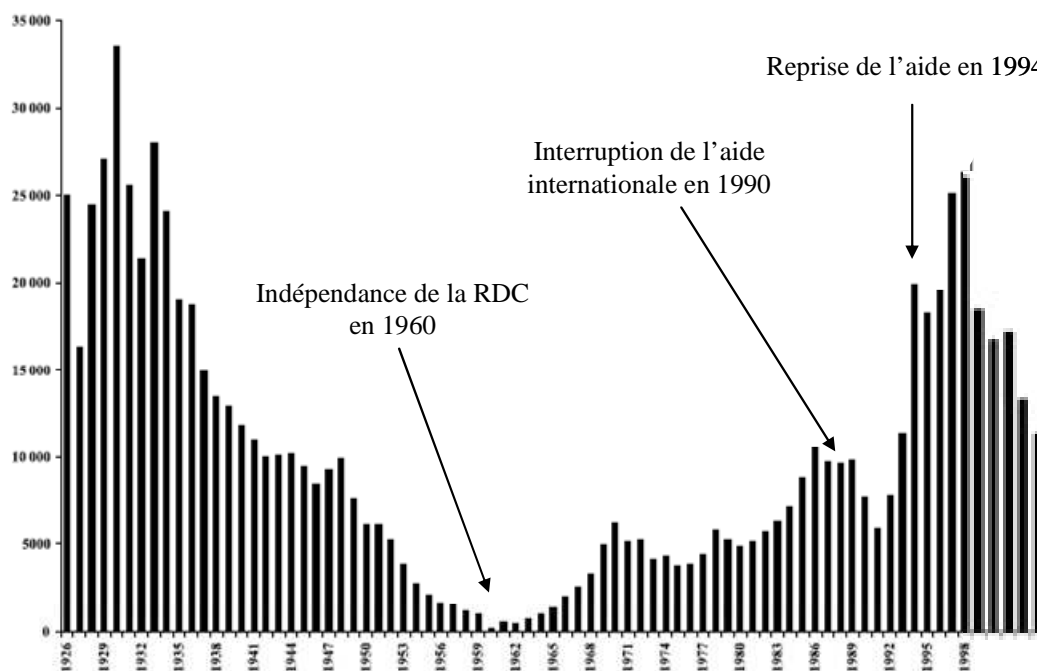


Figure 36. Nombre de nouveaux cas humains de THA détectés en RDC entre 1926 et 2003.
D'après (Van Nieuwenhove *et al.* 2001).

En 2001, une enquête de surveillance épidémiologique a montré un important taux d'infection par des trypanosomes chez 1,07 % de la population dans la province de Bandundu. Cette province héberge la majorité des nouveaux cas recensés dans tout le pays, soit 41.1% (WHO 2006). Le PNLTHA s'inquiète de la persistance de la maladie du sommeil au Nord de la province de Bandundu, notre zone d'étude, où 1.700 nouveaux cas de cette maladie ont été signalés en 2007 (PNLTHA).

Les vecteurs de la THA en RDC

La carte présentée ci-dessous présente la répartition géographique des différentes espèces de glossines recensées à travers la RDC (Figure 37). Plusieurs espèces sont retrouvées au niveau de la zone de Bandundu, *Glossina palpalis quanzensis* apparaît l'espèce majoritaire dans notre zone d'étude.

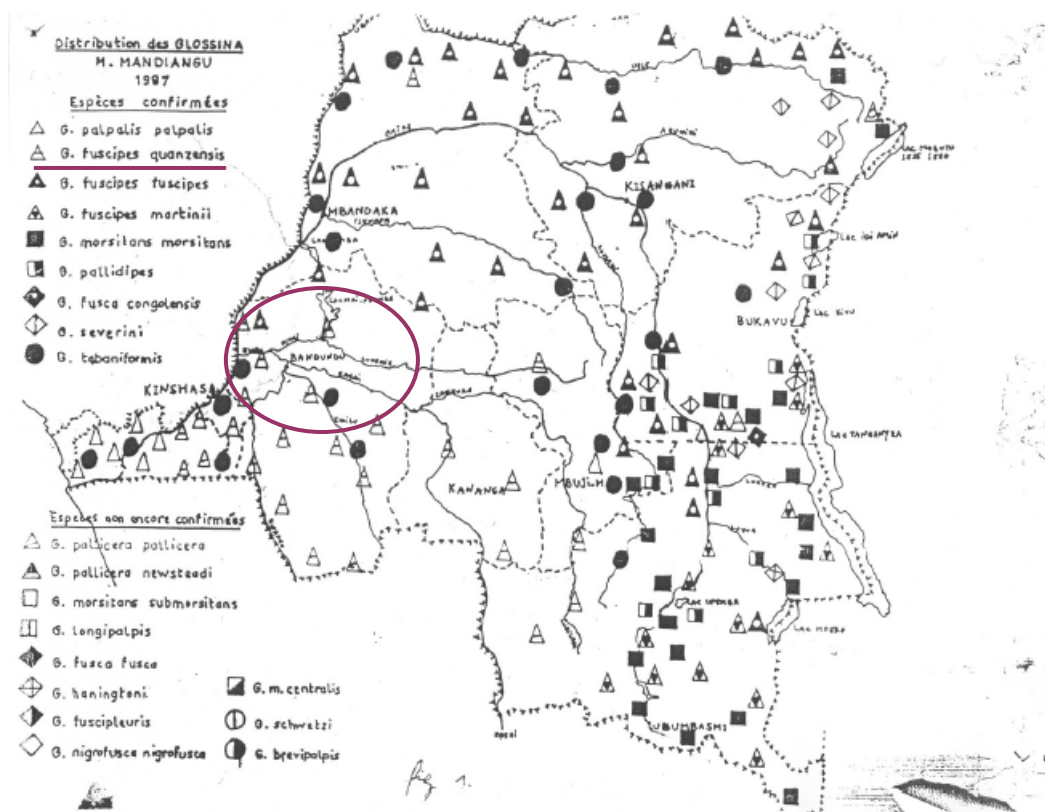


Figure 37. Géo-distribution des espèces de glossines en RDC. La zone d'étude de Bandundu est indiqué par un cercle rouge.

C. Sese du PNLTHA-RDC.(communication personnelle).

1.2 - La réponse IgG spécifique aux extraits salivaires de glossine, un nouvel indicateur immunologique permettant d'identifier les individus exposés aux piqûres des glossines

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans l'American Journal of Tropical Medicine and Hygiene qui est présentée ci-dessous.

Poinsignon A, Remoue F, Rossignol M, Cornélie S, Courtin D, Grebaut P, Garcia A et Simondon F. 2008. Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiological marker of exposure to *Glossina* bites. *Am J Trop Med Hyg* 78: 750-753.

Human IgG Antibody Response to *Glossina* Saliva: An Epidemiologic Marker of Exposure to *Glossina* Bites

Anne Poinsignon,* Franck Remoue, Marie Rossignol, Sylvie Cornelie, David Courtin, Pascal Grébaut, Andre Garcia, and Francois Simondon

Epidémiologie et Prévention, Institut de Recherche pour le Développement, Dakar, Sénégal; Epidémiologie et Prévention, IRD, Montpellier, France; Santé de la mère et de l'enfant en Milieu Tropical, IRD, Paris, France; Interactions Hôtes-Vecteurs-Parasites dans les Trypanosomoses, IRD, Montpellier, France; Santé de la mère et de l'enfant en Milieu Tropical, IRD, Cotonou, Bénin

Abstract. The evaluation of human antibody response specific to arthropod saliva may be a useful marker of exposure to vector-borne disease. Such an immunologic tool, applied to the evaluation of the exposure to *Glossina* bites, could be integrated in the control of human African trypanosomiasis (HAT). The antibody (IgG) response specific to uninfected *Glossina fuscipes fuscipes* saliva was evaluated according to the vector exposure and trypanic status in individuals residing in an HAT-endemic area. A high level of anti-saliva IgG antibodies was only detected in exposed individuals, whether infected or not by *Trypanosoma brucei gambiense*. In addition, the evaluation of specific IgG response represented spatial heterogeneity according to studied sites. These results suggest that the evaluation of anti-saliva IgG could be an indicator of *Glossina* exposure and thus could be integrated in other available tools to identify populations presenting risks of HAT transmission.

INTRODUCTION

Trypanosoma brucei gambiense, the causative agent of the chronic form of human African trypanosomiasis (HAT), is transmitted by infected *Glossina* bites during the blood meal. The disease occurs in West and Central Africa, where 60 million individuals are exposed to the *Glossina* vector. Considered as a neglected disease, many efforts are conducted under WHO recommendations by systematic screening of populations to diagnose infected individuals and to control HAT transmission. These campaigns have shown their potential efficacy in several countries by reducing HAT incidence, such as in the Democratic Republic of Congo (DRC).¹ The weak sensibility and specificity of the useful diagnostic tools requires urgent attention to develop new diagnostic tools distinguishing *Glossina* exposure, early detection of infection, and HAT morbidity stages. The entomological methods are currently the referent methods to evaluate the densities of *Glossina* population but their major limit is the application to the field conditions as a large scale. The use of a geographical information system seems to be an adequate tool to detect favorable ecologic location for colonization of *Glossina* vector.²

HAT morbidity results from complex interactions between the parasite, tsetse fly vector, and human host. Salivary proteins of *Glossina* are injected during the bite to favor the correct blood feeding by using their pharmacologic properties (vasodilators, anti-platelet aggregation, and blood coagulation inhibitors).³ In addition, some salivary proteins are immunogenic in inducing a specific immune response with the production of antibodies (Ab).^{4,5} Studies on different vectors (*Triatoma*, *Aedes*, *Phlebotomus*, *Anopheles*) have suggested that the evaluation of human specific Ab response to saliva and/or to recombinant salivary protein could evaluate the exposure of individuals to vector bites and thus could be an indicator of risk to pathogens transmission.^{6–9} Few studies have explored the immune properties of *Glossina* saliva.¹⁰ Previous study indicated that IgG response to *Glossina mor-*

sitans morsitans saliva and to specific salivary Tsal proteins were detected in exposed and infected Ugandan populations.⁵ Recently, our team highlighted the detection of immunogenic salivary proteins of four *Glossina* species. In individuals living in the Bandundu area (DRC) endemic for sleeping sickness, we showed that the profile of these immunogenic proteins was dependent to the *Glossina* species (vector or not) and to the trypanic status of individuals.⁴ As a next step and to strengthen our hypothesis to elaborate a marker of *Glossina* exposure based on the saliva immunogenicity, the objective of this study was to evaluate, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the IgG Ab level specific to *Glossina fuscipes fuscipes* saliva according to the vector exposure and to the trypanic status of individuals.

MATERIALS AND METHODS

Studied population. The study was conducted using sera from individuals living in the HAT-endemic area of Bandundu in the DRC.¹¹ The status of 71 individuals included in the study was defined using serologic, parasitologic, and molecular studies as previously described.⁴ These results led to defining two groups of exposed individuals (Exp group): 1) the ENI group, which included exposed but uninfected individuals ($N = 52$; 8–62 years old) and 2) the EI group, which included exposed and infected patients in the first and second stage of the disease ($N = 19$; 6–59 years old). A negative control (Nexp group) included individuals ($N = 37$; 21–76 years old) who live in *Glossina* spp.-free area (personnel from Lapeyronie Hospital, Montpellier, France, and autochthons from Reunion island). The study adhered to the ethical principles defined by the Helsinki Declaration and was reviewed and approved by the local Ethical Committee of the DRC (Public Health Ministry 2001). All individuals enrolled in this study signed an informed consent form.

Saliva collection. *Glossina fuscipes fuscipes* is the main *T. brucei gambiense* vector in the Bandundu area. The salivation technique used enabled analysis of biologic material similar to saliva injected in the vertebrate host during natural blood feeding.⁴ Whole saliva extract (WSE) samples from uninfected male and female *G. fuscipes fuscipes* bred in an insectarium (Unit Research 177, IRD) were collected, as previ-

* Address correspondence to Anne Poinsignon, IRD-UR024, Epidémiologie et Prévention, Routes des Pères Maristes, BP 1386, 18524 Dakar, Sénégal. E-mail: anne.poinsignon@ird.fr

ously described.¹² Briefly, the *Glossina* were enclosed in a tube and placed above a drop of salivation buffer (10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, and 5 mmol/L EDTA, pH 7.2) on warm slides (37°C). After 10 minutes of salivation, the saliva solution was collected and stored at -80°C before use. The protein concentration of the saliva solution for female sex (150 µg/mL) and for male sex (250 µg/mL) was evaluated by a bicinchoninic acid test (BCA Protein Assay Kit; Pierce, Rockford, IL). Mixed WSE was done by pooling equal quantities of proteins of both sexes.

Evaluation of human IgG Ab levels. An ELISA technique was carried out using WSE from uninfected mixed male and female *G. fuscipes fuscipes*, and sera were tested for IgG Ab as previously described for *Anopheles*.⁹ Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with mixed WSE (2 µg/mL) in carbonate/bicarbonate buffer and saturated with blocking buffer (Pierce). Individual sera were incubated (1:120) in phosphate-buffered saline (PBS)-Tween 1%, and IgG detection was performed using a mouse anti-human IgG biotinylated mAb (BD Pharmingen, San Diego, CA). Peroxidase-conjugated streptavidin was added (Amersham, Les Ulis, France), and colorimetric development was carried out using [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium (ABTS; Sigma, St Louis, MO) in 50 mmol/L citrate buffer (pH 4) containing 0.003% H₂O₂. Absorbance (OD) was measured at 405 nm. In addition, the absence of significant Ab detection in wells without antigen was verified (ODn). Individual results were expressed as the ΔOD value calculated according to the formula: ΔOD = ODx - ODn, where ODx represented the individuals OD value with antigens wells. A subject was considered as an "immune responder" if its ΔOD was higher than ΔOD mean + (3 × SD) in the unexposed group (Nexp; ΔOD = 0.389).

Statistical analysis. All data were analyzed with the GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA). After verifying that values did not assume a Gaussian distribution, the non-parametric Mann-Whitney *U* test was used for comparison of Ab level between two independent groups and the non-parametric Kruskal-Wallis test for comparison between more than two groups. All differences were considered significant at *P* < 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

The anti-saliva IgG level was compared between individuals exposed (Exp = ENI + EI groups) or not (Nexp group) to *Glossina* bites (Figure 1A). Eighty percent of the exposed individuals were "immune responders" for anti-saliva IgG. The diagnostic value of this specific ELISA test presents the following characteristics: sensibility = 80%, specificity = 100%, positive predictive value = 100%, and negative predictive value = 73%.

A high level of specific IgG Abs was observed in exposed individuals (median = 0.827), whereas baseline IgG level was very low in the Nexp group (median = 0.148). The difference in specific IgG response was highly significant between both groups (*P* < 0.0001). The individuals from the Nexp group, despite living in an area free from *Glossina*, could be exposed to others hematophagous arthropods (*Aedes* spp., *Culex* spp., or *Anopheles* spp.), especially those from Reunion Island.¹³ The very low baseline of specific IgG level in the Nexp group

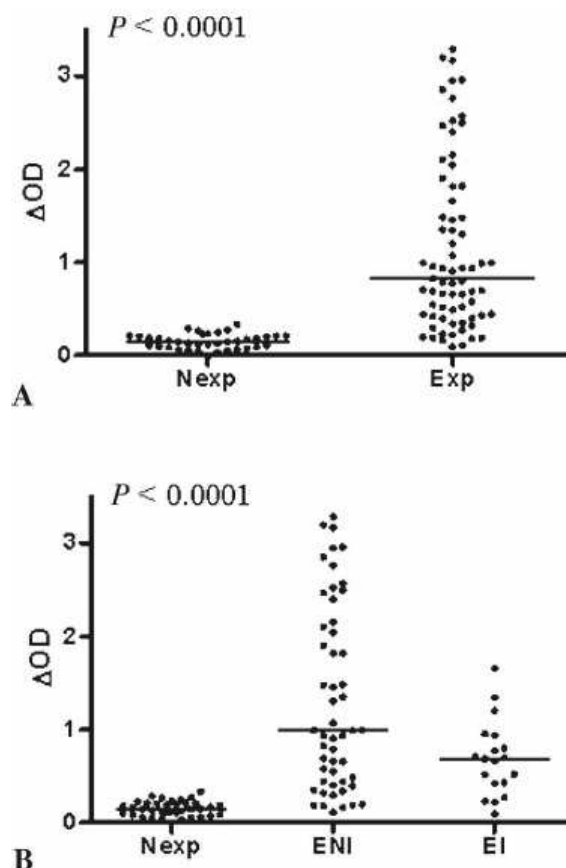


FIGURE 1. Individual IgG Ab levels specific to saliva of the *G. fuscipes fuscipes*. Individual ΔOD results are presented, and bars indicate the median value for each group. The results are presented according to the exposure status A, either exposed (Exp) or not (Nexp) to *Glossina* bites, and according to HAT infected status B, either exposed but uninfected (ENI) or exposed and infected (EI). Statistical significance between three groups is indicated (non-parametric Kruskal-Wallis test).

could indicate the absence of immune cross-reactivity of salivary proteins between *Glossina* and others arthropods. Nevertheless, possible cross-reactivity of tsetse saliva with other *Brachycera* flies, such as tabanids or stable flies, which are more closely related to tsetse than mosquitoes can not be excluded. Altogether, the results suggest that the anti-saliva IgG response could be a selective marker of exposure to *Glossina* bites. In addition, the level of anti-saliva IgG Ab was compared between the Nexp group and infected (EI) group or uninfected (ENI) group individuals (Figure 1B). The specific IgG response remained significantly higher in the ENI group compared with the Nexp group (*P* < 0.0001). However, the anti-saliva IgG response was significantly lower in the EI group compared with the ENI group (*P* = 0.0371). In a sub-analysis according to age (< 35 and > 35 years of age), the difference between the EI and ENI groups was only significant for individuals < 35 years of age (data not shown). Despite several parameters (history of exposure, environmental factors, etc) that could explain this difference, these results

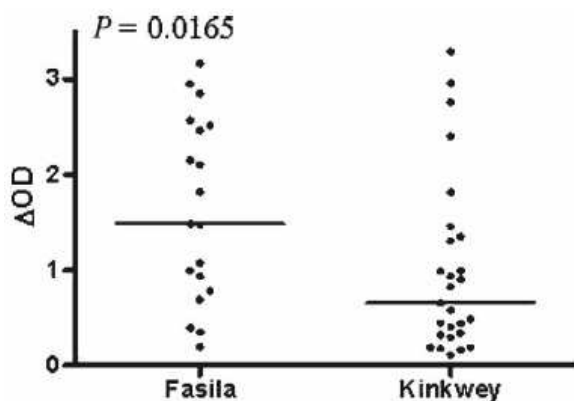


FIGURE 2. Individual IgG Ab levels specific to saliva of the *G. fuscipes fuscipes* in ENI group according to studied villages. Individual Δ OD results are presented, and bars indicate the median value for each group. The results of the exposed but uninfected individuals (ENI group) are shown according to their dwelling place in the region of Bandundu (DRC). Statistical significance between both groups is indicated (non-parametric Mann-Whitney *U* test).

suggest a possible influence of an immuno-suppression phenomenon in HAT-infected individuals as previously described.¹⁴ Nevertheless, anti-saliva IgG level remained considerably higher in the infected (EI group) than in the uninfected (Nexp group) individuals ($P < 0.0001$). This result indicates that the anti-saliva Ab response could be a useful marker of *Glossina* exposure even if individuals are immuno-suppressed because infected.

The anti-saliva IgG response was compared only in ENI individuals according to their dwelling villages with the objective of evaluating the possible spatial heterogeneity of exposure to *Glossina* bites (Figure 2). The specific IgG Ab levels differed significantly ($P = 0.0165$) between the two studied sites. This first approach suggests that the evaluation of anti-saliva IgG response could discriminate the difference of *Glossina* exposure according to studied site, as previously described for *Aedes* exposure.⁷ Nevertheless, further studies including entomologic assessments of precise *Glossina* exposure are necessary to confirm these results according to different levels of exposure.

This study indicated that IgG response to whole saliva could be a potential marker of exposure to *Glossina* bites and, probably, an indicator of the spatial heterogeneity of exposure. However, an optimal marker, in terms of specificity to *Glossina* species (i.e., to avoid cross-reactivity with others arthropods) would be obtained by identifying immunogenic salivary proteins specific 1) to *Glossina* species vector of *Trypanosoma brucei gambiense* and 2) to infected bites.

This study, in complement to previous results identifying species-specific immunogenic salivary proteins and evaluating Ab response to specific recombinant proteins, highlights the potential use of anti-salivary protein Ab response as an immuno-epidemiologic indicator of *Glossina* bite exposure.^{4,5} This tool could allow the mapping and delimitation of foci where the HAT disease prevails and could be integrated into WHO strategies on HAT control in Africa.

Received September 21, 2007. Accepted for publication December 10, 2007.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge the population of the Bandundu area for participation in the study. The authors thank G. Cuny (IRD-UR177) for access to tsetse flies bred in the insectarium and A. M. Dupuy and the occupational health team of Lapeyronie Hospital (Montpellier, France) for access to negative sera from personnel.

Financial support: Anne Poinssignon is supported by a scholarship provided by the Research Ministry of France; Sylvie Cornélie holds a fellowship from the French "Fonds Inkerman" and the "Fondation Singer Polignac"; and David Courtin holds a fellowship from the French "Fondation des Treilles". The study in DRC received grant support from "Institut de Médecine et Epidémiologie Africaine" (IMEA) and the "Institut de Recherche pour le Développement."

Authors' addresses: Anne Poinssignon, IRD-UR024, Epidémiologie and Prévention, Routes des Pères Maristes, BP 1386, 18524 Dakar, Sénégal, Telephone: 221-849-35-55, Fax: 221-832-43-07, E-mail: anne.poinssignon@ird.fr. Franck Remoue, IRD-UR024, Epidémiologie and Prévention, Routes des Pères Maristes, BP 1386, 18524 Dakar, Sénégal, Telephone: 221-849-35-33, Fax: 221-832-43-07, E-mail: remoue@ird.sn. Marie Rossignol, IRD-UR024, Epidémiologie and Prévention, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, Telephone: 33-4-67-41-63-32, Fax: 33-4-67-41-63-30, E-mail: senglat@mpl.ird.fr. Sylvie Cornélie, IRD-UR024, Epidémiologie and Prévention, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, Telephone: 33-4-67-41-61-48, Fax: 33-4-67-41-63-30, E-mail: cornelie@mpl.ird.fr. David Courtin, IRD-UR010, Santé de la mère et de l'enfant en milieu tropical, Faculté de pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris, France, Telephone: 33-1-53-73-96-17, Fax: 33-1-53-73-96-17, E-mail: d.courtin@gmail.com. Pascal Grébaut, LRCT IRD/CIRAD, UMR 177, Interactions Hôtes-Vecteurs-Parasites dans les Trypanosomoses, TA 207 G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier cedex 5, France, Tel/Fax: 33-4-67-59-39-25, E-mail: pascal.grebaut@ird.fr. Andre Garcia, IRD-UR010, Santé de la mère et de l'enfant en Milieu Tropical, La résidence "Les cocotiers," 08 BP 841 Cotonou, Bénin, Telephone: 229-21-30-98-21, Fax: 229-21-95-45-51-14, E-mail: andre.garcia@ird.fr. Francois Simondon, IRD-UR024, Epidémiologie and Prévention, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, Telephone: 33-4-67-41-61-62, Fax: 33-4-67-41-63-30, E-mail: francois.simondon@mpl.ird.fr.

REFERENCES

1. Lutumba P, Robays J, Miaka mia Bilenge C, Mesu VK, Molisho D, Declercq J, Van der Veken W, Meheus F, Jannin J, Boelaert M, 2005. Trypanosomiasis control, Democratic Republic of Congo, 1993–2003. *Emerg Infect Dis* 11: 1382–1388.
2. Rogers DJ, Williams BG, 1993. Monitoring trypanosomiasis in space and time. *Parasitology* 106 (Suppl): S77–S92.
3. Ribeiro JM, 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4: 143–152.
4. Poinssignon A, Cornélie S, Remoue F, Grébaut 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.
5. Caljon G, Van Den Abbeele J, Sternberg JM, 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: 1025–1035.
6. 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.
7. Remoue F, Alix E, Cornélie 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.
8. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinas 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.
9. 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: 363–370.
 10. Ellis JA, Shapiro SZ, ole Moi-Yoi O, Moloo SK, 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: 661–667.
 11. Courtin D, Jamonneau V, Mathieu J-F, Koffi M, Milet J, Yeminanga CS, Kumeso VKB, Cuny G, Bilengue CMM, Garcia A, 2006. Comparison of cytokine plasma levels in human African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health* 11: 647–653.
 12. Gidudu AM, Cuisance D, Reifenberg JM, Frezil JL, 1995. Improving the salivation technic in the tsetse fly for the detection of infective metatrypanosomes: study of the effect of biologic and non-biologic factors in the probing behavior of the tsetse fly]. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 48: 153–160.
 13. Julvez J, Ragavoodoo C, Gopaul AR, Mouchet J, 1998. Human diseases transmitted by *Culicidae* in southwest Indian Ocean islands. *Bull Soc Pathol Exot* 91: 99–103.
 14. Vincendeau P, Okomo-Assoumou MC, Semballa S, Fouquet C, Daulouede S, 1996. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Med Trop (Mars)* 56: 73–78.

Résumé des travaux

L'objectif final de ces travaux était d'évaluer si la réponse anticorps anti-salive de glossine pourrait être un marqueur immuno-épidémiologique permettant d'évaluer le degré d'exposition individuel de l'homme à la piqure de ces insectes.

Pour cela, nous avons évalué le taux d'Ac IgG spécifiques à la salive de glossine chez des personnes vivant en zone d'endémie en RDC (infectées ou non) et des personnes n'ayant jamais été en contact avec ces insectes (témoins européens). Les personnes vivant en zone de transmission de la THA présentaient un très fort taux d'Ac IgG spécifiques contrairement aux individus non exposés. La comparaison des niveaux de réponse IgG anti-salive entre ces personnes nous a permis de définir les caractéristiques épidémiologiques de ce test évaluant l'exposition. Avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 80 %, ce marqueur immunologique d'exposition présentait donc des caractéristiques épidémiologiques pertinentes. Par ailleurs, les variations quantitatives de cette réponse Ac semblaient également apprécier l'hétérogénéité spatiale d'exposition à la piqure des glossines. L'ensemble de ces travaux semble indiquer que l'évaluation du taux d'IgG spécifiques à la salive des glossines, et au risque de transmission de la THA, permettrait de distinguer les personnes exposées ou non à la piqure de ces insectes et permettrait également de distinguer les niveaux de risque d'exposition entre villages.

Dans cette étude, nous avons observé que les personnes résidant en zone d'endémie, donc exposées aux piqures de glossines, développaient une réponse IgG à la salive de *G. fuscipes fuscipes*. La principale espèce de glossine dans la zone de Bandundu est *G. fuscipes quanzensis*, mais cette espèce n'est pas élevée en insectarium, nous avons donc du évaluer la réponse IgG des individus contre la salive de *G. fuscipes fuscipes* dont un élevage est maintenu au sein de l'IRD-UR177. Ces deux espèces étant très proches phylogénétiquement, nous avons supposé que leur composition salivaire devait être similaire en terme de nature de protéines salivaires. Cependant les taux d'IgG mesurés ont pu être sous-estimés.

La technique de recueil des extraits salivaires utilisée est originale (Figure 38) comparée à l'utilisation de glandes salivaires obtenues après dissection. Notre procédé nous permet de travailler sur un contenu salivaire proche de celui injecté lors d'une piqure naturelle.



Figure 38. Séance de salivation de glossines.

Les glossines sont privées de nourriture les 2 jours précédant la salivation afin de stimuler leur appétit. Les glossines sont réparties par groupe de 5 dans des tubes fermés par de la moustiquaire. Une lame à microscope où sont déposés quelques dizaines de microlitres de tampon de salivation est posée sur une plaque chauffante réglée à 37°C. Le tube contenant les glossines est posé sur la lame, permettant ainsi aux glossines de saliver. Le mélange tampon/salive est recueilli et regroupé par espèce et par sexe dans des tubes qui sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

1.3 - Vers l'identification de protéines salivaires immunogéniques candidates pour l'élaboration d'un marqueur d'exposition

Dans la perspective de développer un outil immuno-épidémiologique évaluant l'exposition de l'homme aux piqûres de glossines à grande échelle, l'utilisation des extraits totaux salivaires n'est pas envisageable. La technique de recueil de la salive est relativement longue et fastidieuse et elle ne permet pas d'obtenir des lots homogènes entre les différentes séances de salivation, on a remarqué essentiellement des variations au niveau des concentrations des protéines dans les différents lots de salive recueillis.

Un marqueur immuno-épidémiologique d'exposition optimal devra présenter des caractéristiques intrinsèques i) permettant la reproductibilité du test immunologique, ii) assurant la spécificité à des espèces ou à un genre d'insecte, i.e. évitant les réactions immunologiques croisées avec d'autres protéines d'organismes vivants (dont les autres arthropodes vecteurs) et iii) dont l'immunogénicité est associée positivement avec le degré d'exposition des individus.

Dans cet objectif, il nous paraissait important de comparer la composition salivaire de différentes espèces de glossines, vectrices ou non de *T.b.gambiense*. Cette approche pourrait

orienter le choix de la protéine candidate en fonction de sa spécificité ou de son caractère ubiquitaire parmi les espèces glossiniennes.

Nous avons identifié trois stratégies pour sélectionner, parmi la salive totale, les protéines salivaires candidates pour l'élaboration d'un marqueur d'exposition. Ces stratégies sont présentées dans la figure 39.

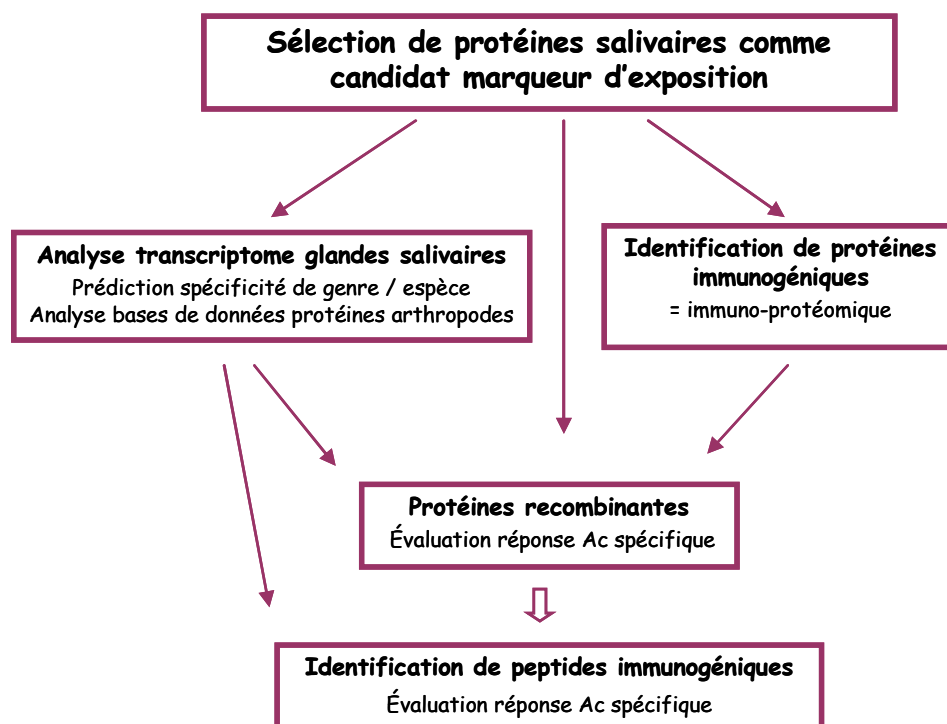


Figure 39. Stratégies permettant l'identification de candidats salivaires pour l'élaboration de marqueur d'exposition.

La première stratégie consiste à explorer les bases de données disponibles (par exemple Vectorbase, Genbank) décrivant la composition en protéines des glandes salivaires et d'identifier une ou des protéines présentant des caractéristiques requises en fonction de l'objectif défini. A ce niveau la sélection se fera sur la présence d'un peptide signal au niveau de la séquence des gènes, séquence qui indique que cette protéine salivaire peut être sécrétée et donc participer à la relation homme-vecteur. L'évaluation de l'immunogénicité des protéines sélectionnées permettra d'affiner la sélection. Le génome de *G. morsitans morsitans* est actuellement en cours d'annotation (Aksoy *et al.* 2005).

La deuxième stratégie consiste à tester l'immunogénicité de protéines ou de peptides salivaires synthétisés chimiquement (peptide à façon) ou biologiquement (protéine recombinante).

La dernière stratégie consiste à étudier le contenu salivaire par l'outil d'immuno-protéomique. L'association d'une électrophorèse suivie d'une immuno-empreinte permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire et de détecter celles qui présentent des propriétés immunogéniques (car reconnues par les anticorps présents dans le sérum d'individus piqués par les glossines). Nous avons orienté nos travaux vers cette stratégie. Elle permet de sélectionner des protéines salivaires sur la base de leur immunogénicité.

Nous avons comparé la composition en protéines salivaires de quatre espèces de glossines, trois espèces pouvant être vectrices de *T.b.gambiense* (*G. fuscipes fuscipes*, *G. tachnoides*, *G. palpalis gambiense*) et une espèce non vectrice (*G. morsitans morsitans*). Nous avons également détecté les protéines majoritairement immunogéniques reconnues spécifiquement par les IgG présents dans les sérums d'individus exposés aux piqûres des glossines en RDC.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans l'American Journal of Tropical Medicine and Hygiene présentée ci-dessous:

Poinsignon A, Cornелиe S, Remoue F, Grebaut P, Courtin D, Garcia A et 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.

HUMAN/VECTOR RELATIONSHIPS DURING HUMAN AFRICAN TRYPANOSOMIASIS: INITIAL SCREENING OF IMMUNOGENIC SALIVARY PROTEINS OF *GLOSSINA* SPECIES

ANNE POINSIGNON,* SYLVIE CORNELIE, FRANCK REMOUE, PASCAL GRÉBAUT, DAVID COURTIN,
ANDRE GARCIA, AND FRANCOIS SIMONDON

Epidémiologie et Prévention, et Interactions Hôtes-Vecteurs-Parasites dans les Trypanosomoses Unité de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France; Epidémiologie et Prévention Unité de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement, Dakar, Senegal; Santé de la Mère et de L'Enfant en Milieu Tropical Unité de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement, Paris, France; Santé de la Mère et de L'Enfant en Milieu Tropical Unité de Recherche, Institut de Recherche pour le Développement, Cotonou, Benin

Abstract. The morbidity and mortality of vector-borne diseases is closely linked to exposure of the human host to vectors. Qualitative and quantitative evaluation of individual exposure to arthropod bites by investigation of the specific immune response to vector saliva would make it possible to monitor individuals at risk of vectorial transmission of pathogens. The objective of this study was to evaluate and compare the antibody (IgG) response to saliva from uninfected *Glossina* species, vectors, or non-vectors of *Trypanosoma brucei gambiense* by detecting immunogenic proteins in humans residing in an area endemic for human African trypanosomiasis in the Democratic Republic of Congo. Our results suggest that the immunogenic profiles observed seemed specific to the *Glossina* species (vector or non-vector species) and to the infectious status of exposed individuals (infected or not infected). This preliminary work tends to support the feasibility of development of an epidemiologic tool based on this antibody response to salivary proteins.

INTRODUCTION

The chronic form of sleeping sickness (human African trypanosomiasis [HAT]) caused by *Trypanosoma brucei gambiense* is found in western and central Africa and is transmitted to humans by bites of the *Glossina* vector (tsetse fly). Among vector *Glossina* species, *Glossina palpalis*, *G. tachinoides*, and *G. fuscipes* are able to transmit *T. b. gambiense*. This slowly progressing fatal disease often remains undiagnosed because of lack of specific symptoms observed during its initial stage, and the infection is readily confused with other febrile illnesses, especially malaria.¹ The World Health Organization (WHO) has recommended systematic screening of populations by serologic survey to diagnose infected individuals and to control HAT transmission.² In the mid 1980s, the incidence of HAT increased to alarming levels comparable to those of the early 20th century, particularly in the Democratic Republic of Congo, and it now represents a major public health problem.³ This re-emergence can be partly explained by laxity in control and research efforts. In view of this alarming situation, intensification of active case detection and treatment was initiated by the national control programs of disease-endemic countries and results seem promising; WHO recently reported a decrease in the number of new reported cases.⁴

The morbidity and mortality of sleeping sickness is closely linked to transmission of the pathogen by the vector, and is therefore associated with exposure of the human host to infected *Glossina* bites. However, the relationship between the presence of vectors and the prevalence of the disease is complex, and other parameters must be considered when evaluating risk of infection.^{5,6} This complexity underlines the importance of developing new tools to identify populations ex-

posed to a high risk of transmission and which could enable optimization of epidemiologic surveillance and identification of individuals who may benefit from monitoring. Currently, exposure of populations to the *Glossina* vector is evaluated by entomologic methods (e.g., capture by traps), but such methods cannot evaluate heterogeneous individual exposure.⁷

During blood feeding, insects inject salivary proteins (sialome), primarily to counteract the host hemostasis response induced by the bite. The pharmacologic properties of these proteins, such as platelet aggregation inhibitors, vasodilators, and inhibitors of blood coagulation, are necessary for blood feeding.⁸ Some of these salivary proteins also have immunogenic characteristics (immuno-sialome) that enable initiation of a specific immune response.⁹ Based on these immune properties, studies have shown the potential of markers of exposure to vector-borne diseases by evaluation of a specific antibody response to salivary proteins in individuals exposed to the arthropod vector. The first example of an epidemiologic indicator was reported in the United States in individuals infected with *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme disease.¹⁰ The level of IgG antibody specific for *Ixodes damini* tick saliva was higher in individuals at high risk of developing Lyme disease.¹¹ Moreover, specific IgG1 and IgG4 isotypes of antibody to *Triatoma* salivary antigens have been detected in individuals exposed to Chagas disease and the level of specific IgG4 of *Aedes aegypti* saliva might be a marker of intense exposure to *Aedes* bites.^{12–15} It has been also suggested that immune response to sand fly recombinant salivary gland protein may be a good marker of vector exposure.¹⁶ Recently, it has been shown that children from a malaria-endemic area in Senegal developed a specific IgG response to *Anopheles gambiae* saliva that was positively associated with the degree of exposure to vector bites evaluated by classic entomologic studies.¹⁷ In addition, high levels of IgG antibody to saliva appeared to be a predictive indicator of malaria morbidity.

Few studies have explored the immunogenic properties of *Glossina* saliva in sleeping sickness. Immediate or delayed

* Address correspondence to Anne Poinignon, Epidémiologie et Prévention, Unité de Recherche 024, Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier CEDEX 5, France. E-mail: anne.poinignon@mpl.ird.fr

hypersensitivity responses have been observed in humans and rabbits exposed to tsetse fly bites, suggesting immunogenic properties of *Glossina* saliva.^{18,19} Another study attempted to identify an epidemiologic indicator of human contact with *Glossina* by detection of specific antibody of *Glossina* salivary glands in human sera, but the immunologic techniques used (immunoelectrodiffusion) failed to detect an immunologic response.²⁰

The present study represents a new attempt to evaluate the immune response to tsetse fly bites in human populations in an area endemic for sleeping sickness. The objective of the study was to detect immunogenic salivary proteins of *Glossina* (vector and non-vector species) and to compare the profiles of these immunogenic proteins, taking into account the infectious status of individuals living in an area endemic for HAT.

MATERIALS AND METHODS

Studied population. The study was conducted using sera from individuals living in the HAT-endemic area of Bandundu in the Democratic Republic of Congo.²¹ The status of 74 individuals included in the study was defined using serologic (card agglutination trypanosoma tests for *T. b. gambiense* and trypanolysis test), parasitologic, and molecular (polymerase chain reaction) investigations.^{22,23} Stage diagnosis was carried out for all sleeping sickness cases ($n = 19$), by counting white blood cells present in the cerebrospinal fluid (CSF). These results led to defining three groups of individuals: 1) the ENI group, which included exposed but non-infected individuals ($n = 55$) who had no positive test results; 2) the P1 group, which included exposed and infected patients in the first stage of the disease ($n = 7$) who had positive test results and < 5 white blood cells/ μ L in CSF; and 3) the P2 group, which included exposed and infected patients in the second stage of the disease ($n = 12$) who had positive test results and ≥ 5 white blood cells/ μ L in the CSF. A negative control (CHU) group included individuals ($n = 16$) who were never exposed to *Glossina* spp. bites; it included personnel from Lapeyronie Hospital (Montpellier, France). The study adhered to the ethical principles defined by the Helsinki Declaration, and was reviewed and approved by local traditional authorities and by the local Ethical Committee of the Democratic Republic of Congo (Public Health Ministry, 2001). All individuals enrolled in this study signed an informed consent form.

Saliva collection. Saliva samples from uninfected male and female *Glossina* bred in an insectarium (Unité de Recherche 177, Institut de Recherche pour le Développement) were collected. The tsetse flies were enclosed in a tube by a mosquito net and the tube was placed above a drop of salivation buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 5 mM EDTA, pH 7.2) on warm slides (37°C).²⁴ After 10 minutes of salivation, the saliva solution was collected, pooled, and stored at -20°C before use. The saliva of four tsetse flies species was collected: three vector species of *T. b. gambiense*: (*G. fuscipes fuscipes*, *G. tachinoides*, and *G. palpalis gambiensis*) and one non-vector species of *T. b. gambiense* (*G. morsitans morsitans*).

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Prior to electrophoresis, salivary proteins were precipitated. A volume of salivary samples was diluted with nine volumes of ice-cold (-20°C) 80% ethanol. The mixtures were incubated for one hour at -20°C and centrifuged at

13,000 rpm at 4°C for 30 minutes. The supernatants were removed and 1 mL of ice-cold (-20°C) 70% ethanol was added. Samples were centrifuged as above for 20 minutes. The supernatants were removed and the pellets were air-dried. For one-dimensional gel electrophoresis, pellets were suspended in a mixture of 5× Laemmli:salivation buffer (1:4). Based on the evaluation of the protein concentration by bicinchoninic acid (BCA) test (BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, IL), equal quantities of *Glossina* salivary proteins (7 μ g) were deposited in each well for electrophoresis. Salivary proteins were separated by one-dimensional electrophoresis on a 4–15% gradient acrylamide gel in Tris-glycine buffer with SDS (Ready gels Tris-HCl; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Separated proteins were observed by staining with silver nitrate solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) based on a modified method of Shevchenko and others.²⁵ Gels were fixed twice for 30 minutes in 30% ethanol and 5% acetic acid and then washed four times in MilliQ water. Gels were sensitized for one minute in 0.02% sodium thiosulfate, washed twice (one minute/wash) with MilliQ water, incubated in 0.1% silver nitrate containing 0.06% formaldehyde for 45 minutes, and washed with MilliQ water. Proteins were then visualized in developing solution (0.05% sodium carbonate, 0.06% formaldehyde; Sigma-Aldrich) until a desired level of staining was achieved, after which development was stopped with 5% acetic acid.

Immunoblotting. The proteins separated by one-dimensional electrophoresis were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad Laboratories) in Tris-glycine buffer at 100 mA for one hour and at 300 mA for one hour. The membrane was then washed three times with Tris-buffered saline (TBS) and blocked with 5% skim milk in TBS for one hour. The membrane was washed three times with TBS containing 0.1% Tween 20 and three times with TBS, and then equilibrated with 2% skim milk in TBS for 20 minutes. Immunogenic proteins were detected by incubation of the membrane with human sera (1:150) overnight at 4°C. Mouse anti-human IgG conjugated to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) were added at a dilution of 1:5,000. Before and after addition of the secondary antibody, the membrane was washed three times in TBS containing 0.1% Tween 20 and three times with TBS. The membrane was incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium substrate (Sigma-Aldrich) until a desired level of staining was achieved and digitized by a personal densitometer SI (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

RESULTS

***Glossina* sialomes.** The profiles of salivary proteins (sialomes) from male and female *Glossina*, both vector or non-vector species, are shown in Figure 1. Approximately 15–20 bands with molecular weights of 11–240 kD were observed in saliva samples of each *Glossina* species. Saliva of the three potential vector species of *T. b. gambiense* (*G. fuscipes fuscipes*, *G. tachinoides*, and *G. palpalis gambiensis*) had many common bands (approximately 24, 27, 33, 37, 39, 54, 60, 70, 100, 110, 130, and 150 kD) with some variations in intensity of silver staining. Some of these proteins were also detected in *G. morsitans morsitans* saliva, but non-vector saliva contained more proteins with molecular weights of approximately 50–72

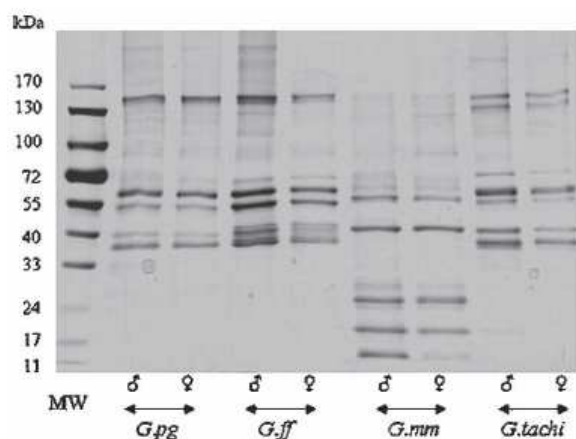


FIGURE 1. Protein composition of saliva from uninfected male (♂) and female (♀) *Glossina* species. Shown are three vector species (*Glossina palpalis gambiensis* [G.pg], *G. fuscipes fuscipes* [G.ff], *G. tachinoides* [G.tachi]) and 1 non-vector species (*G. morsitans morsitans* [G.mm]) of *Trypanosoma brucei gambiense*. Saliva were analyzed by 4–15% gradient one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis under non-reducing conditions and silver staining. Molecular mass markers (MW) are shown on the left in kilodaltons (kDa).

kD when compared with vector species. Low molecular weight proteins (11–33 kD) were found in the eight saliva samples, but the intensity of silver staining appeared higher in *G. morsitans morsitans* saliva. The protein profile of *Glossina* saliva appeared to be species specific, with strong similarities between vector species and important differences in non-vector species *G. morsitans morsitans*. The composition of saliva appeared similar in females and males for all *Glossina* species.

Detection of immunogenic proteins according to *Glossina* species. We evaluated the immunogenic profile of *Glossina* salivary proteins (immuno-sialome) by immunoblotting with a pool of sera of exposed but non-infected persons (ENI group) (Figure 2). An IgG antibody response specific to saliva samples of each *Glossina* species was detected and the immunogenic profile appeared to be different according to the *Glossina* species.

For each saliva sample, 10–15 bands were detected. Some bands (37, 39, 54, 60, 70, 95, and > 170 kD) were common to the four species tested. However, the immunogenic profile of non-vector saliva was different from that obtained with saliva of vector species. This difference was closely linked to the immunogenicity of specific proteins observed only in *G. morsitans morsitans* saliva (50, 55, 65, and 72 kD; Figure 2). We also detected a specific band of approximately 42 kD in *G. fuscipes fuscipes* saliva (Figure 2). In addition, the intensity of immunogenic bands differed according to *Glossina* species. For example, the double band of approximately 130 kD detected in the saliva of the four species (Figure 1) showed higher immunogenic characteristics only in *G. morsitans morsitans*. In addition, we observed a signal that had a staircase appearance at the low molecular weight range in the vector species. No relevant differences were observed in the immunogenic profile between male and female saliva for any of the *Glossina* species. Thus, immunogenicity of salivary proteins did not appear to be sex dependent for any *Glossina* species.

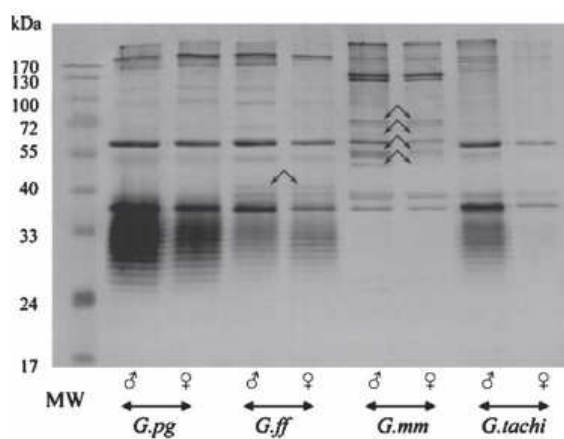


FIGURE 2. IgG immunogenic profile of salivary proteins in male (♂) and female (♀) *Glossina* species in exposed but non-infected persons. Arrows in gel show immunogenic salivary proteins specific to *G.ff* and *G.mm* species. For definitions of abbreviations, see Figure 1. Molecular mass markers (MW) are shown on the left in kilodaltons (kDa).

Detection of immunogenic proteins of *G. fuscipes fuscipes* saliva according to the trypanic status of exposed individuals. We evaluated the immunogenicity of salivary proteins during chronic evolution of sleeping sickness by comparing the immune profiles of *G. fuscipes fuscipes* saliva between individual groups (pools of sera) with varying trypanic status: exposed but non-infected persons (ENI group), infected individuals (P1 and P2 groups), and negative controls (CHU group). Results were obtained for saliva from *G. fuscipes fuscipes* because this species is the main vector of *T. b. gambiense* in the Democratic Republic of Congo. Figure 3 shows results for male *G. fuscipes fuscipes* saliva; similar results for each group were observed in females and mixed (male plus female) saliva samples. We observed four major bands (37, 54, 60, and 150 kD) in the three exposed groups regardless of the HAT status. In addition, four minor bands with low immunogenicity (90, 95, 110, and 125 kD) were detected in these three groups. The infected groups (P1 and P2) showed similar immunogenic profiles. In contrast, a difference in the immunogenic profiles was detected between infected patients (P1 and P2 groups) and exposed but non-infected individuals (ENI group). Some salivary proteins (four bands between 37 kD and 42 kD) were immunogenic only in the ENI group. Surprisingly, weak intensity of three immunogenic proteins (54, 60, and 150 kD), the major 37-kD band, and the previously observed staircase signal were observed in the CHU group.

Analysis of the individual immunogenic profile in *G. fuscipes fuscipes* saliva. We investigated the immunogenic profile of exposed but non-infected (ENI) and infected (P1) individuals to mixed *G. fuscipes fuscipes* saliva (female plus male). This study was carried out on nine ENI patients (Figure 4A) who were randomly selected, and on all persons in the P1 group (n = 7; Figure 4B).

The profiles of individuals in the ENI group were heterogeneous, which suggested variability in the immunogenicity of salivary proteins among individuals with the same trypanic status. The four major immunogenic bands (37, 54, 60, and

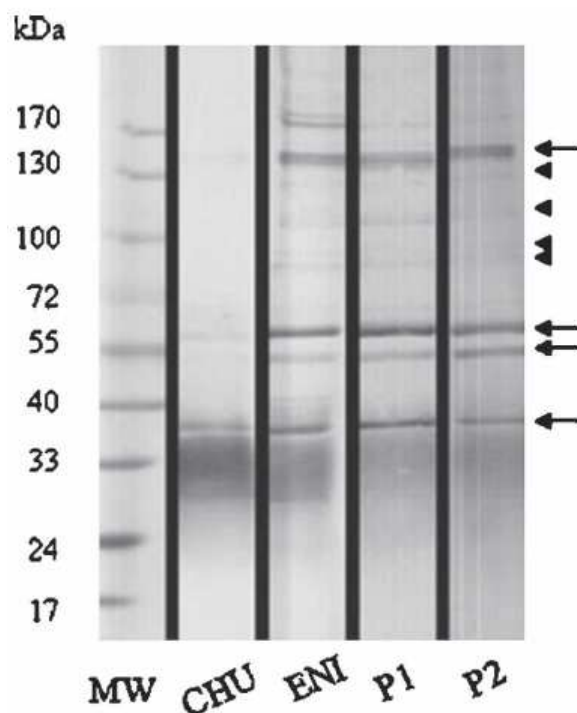


FIGURE 3. IgG immunogenic profile of *Glossina fuscipes fuscipes* saliva in three patients groups (ENI, P1, and P2) and to the non-exposed group (CHU). Arrows shows four major bands and arrow-heads show four minor bands commonly detected in the three exposed groups. ENI = exposed but non-infected individuals with no positive results for four tests; P1 = exposed and infected patients in the first stage of the disease who had positive results for four tests; P2 = exposed and infected patients in the second stage of the disease who had positive results for four tests. Molecular mass markers (MW) are shown on the left in kilodaltons (kDa).

150 kD) and two minor bands with low immunogenicity (90 and 110 kD) differed in intensity among persons in the ENI group. In addition, such individual variations were also observed for ENI-specific proteins of approximately 37–42 kD.

In contrast, a similar profile of immunogenic salivary proteins was observed among persons in the P1 group. Most individuals in this group showed a specific IgG antibody response to the four major bands (37, 54, 60, and 150 kD) with particularly high immunogenicity for three of them (37, 60, and 150 kD). In addition, this homogeneity of the profile of P1 individuals was observed with two bands having low immunogenicity (70 and 110 kD). Most individual profiles (ENI and P1) had the previously observed staircase signal at low molecular weights.

DISCUSSION

In the present study, specific immune responses to salivary proteins of *Glossina* were detected in humans residing in an area endemic for a sleeping sickness. We demonstrated that the specific antibody response to these immunogenic proteins was dependent on the *Glossina* species and the infection status of studied individuals.

Previous studies on *Glossina* saliva had been carried out

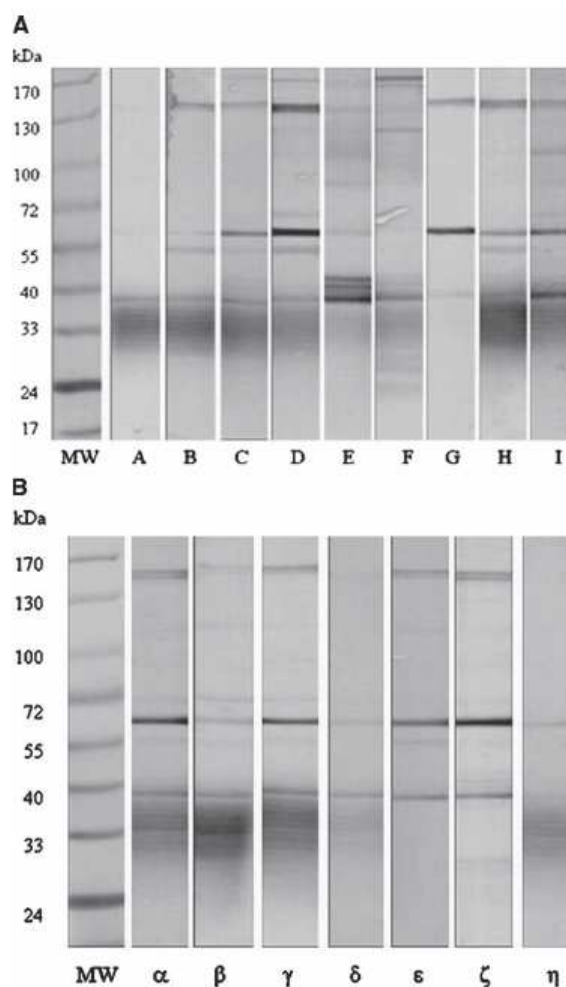


FIGURE 4. A, Individual IgG immunogenic profile of *Glossina fuscipes fuscipes* saliva in nine individuals (A–I) from the exposed but non-infected group (ENI). B, Individual IgG immunogenic profile of *G. fuscipes fuscipes* saliva in seven individuals (α–η) from the exposed and infected group (P1). Molecular mass markers (MW) are shown on the left in kilodaltons (kDa).

principally on salivary glands (cDNA bank or protein extraction) of non-vector *Glossina* species of *T. b. gambiense* (*G. morsitans morsitans* and *G. morsitans centralis*), but salivary glands contain structural proteins that are not secreted during biting.¹⁹ Nevertheless, they enable identification of some proteins with pharmacologic properties involved in inhibition of the human host hemostasis response.²⁶ In the present study, the salivation technique used enabled analysis of biologic material similar to saliva injected in the vertebrate host during natural blood feeding. This enabled identification of components involved in the host/vector relationship. The sequencing of an extensive set of expressed sequence tags of the *G. morsitans morsitans* salivary gland is currently being carried out and should confirm the effectiveness of our salivation technique.²⁷

In the present study, analysis of sialomes identified 15–20 bands by one-dimensional SDS-PAGE. It would be useful to

determine whether one band corresponds to one or more proteins. Such identification could be performed by separating the salivary proteins by two-dimensional electrophoresis and analyzing them by mass spectrometry. However, we have shown that numerous bands are common to *Glossina* species, but other bands are present only in potential vector species (*G. fuscipes fuscipes*, *G. tachinoides*, and *G. palpalis gambiense*) and non-vector species (*G. morsitans morsitans*) of *T. b. gambiense*. This difference in saliva composition, including the presence or absence of certain salivary proteins, could be involved in vector capacity of the *Glossina* species. For example, a salivary protein may be essential for continuation of the parasite maturation cycle in the vector, as suggested in the *Anopheles* mosquito.²⁸

To our knowledge, the present study is also the first description of *Glossina* immuno-sialome carried out by investigating the specific human IgG response to *Glossina* saliva in a population exposed to HAT. Previously, hypersensitivity reactions of an immediate or delayed type were observed in humans, but specific salivary components involved had not been identified.^{18,20} Moreover, a previous study described sialome and immunogenic salivary proteins of *G. morsitans centralis* that were detected by IgG antibodies from sensitized rabbits.¹⁹

Comparison of immuno-sialomes of the four *Glossina* species shows a difference in the profile of immunogenic proteins according to species. This difference was greater between *Glossina* vector species or non-vector species of *T. b. gambiense*, as we observed in sialome analyses. Most of these immunogenic proteins were common to the four *Glossina* species. Nevertheless, the immunoblotting approach distinguished immunogenic proteins specific to *Glossina* species (42 kD specific for *G. fuscipes fuscipes* and 50, 55, 65, and 72 kD specific for *G. morsitans morsitans*). Species-specific antigens were also identified in *Phlebotomus* and *Aedes* species.^{29,30} The difference in immunogenic protein composition in *Glossina* species may also be involved in transmission of the parasite. For example, the immune response induced by specific proteins of non-vector *G. morsitans morsitans* (50, 55, 65, and 72 kD) could play a role in preventing infection permissiveness. It has been demonstrated that the specific immune response to one *Phlebotomus* salivary antigen (PpSP15) can confer protection against the development of leishmaniasis in animal models.³¹

Another difference between vector and non-vector *Glossina* species was also observed. A signal (< 37 kD) in the form of bands in a staircase pattern was only detected in saliva of *Glossina* vector species (*G. fuscipes fuscipes*, *G. tachinoides*, and *G. palpalis gambiense*). One hypothesis is that this signal could be an artifact of handling. In addition, endosymbiont *Sodalis glossinidius* bacteria can be found at the level of salivary glands of certain *Glossina* species, but are absent in *G. morsitans morsitans* salivary glands.³² Another hypothesis is that proteins of these bacteria are secreted during *Glossina* bites and induce a specific immune response in humans. The staircase signal was also detected in *G. fuscipes fuscipes* saliva using sera from the CHU group, which was not exposed to *Glossina* bites and thus was not exposed to *S. glossinidius*. This surprising result may also represent the same artifact of handling or detection of cross-reactivity with compounds of other bacteria. Moreover, numerous bacteria express proteins on their surface that bind to the Fc regions of IgG, which will

enable these bacteria to be covered with host protein and escape the defense mechanism of the host.³³ Some bands observed in the presented immunoblottings might be linked to this bacterial capacity. Such proteins from bacterial surfaces could be present in *Glossina* saliva and thus bind IgG antibodies (human antibodies in serum and/or secondary antibodies used in the assay) in a non-specific manner. In addition, three bands with low immunogenicity (54, 60, and 150 kD) were detected with the sera of the CHU group, which also suggests immune cross-reactivity. This could be due to cross-reactions between common epitopes of arthropod salivary proteins from mosquitoes, horseflies, and sand flies. Further investigations are necessary to define the immunologic specificity of salivary proteins of *Glossina*.

We also studied the relationship of immuno-sialome to the specific immunogenic profile relative to the trypanic status of individuals (exposed but non-infected [ENI] and infected [P1 and P2]). We investigated the specific immune response to *G. fuscipes fuscipes* because this species is the main vector species of *T. b. gambiense* in the Democratic Republic of Congo. Immunoblotting with a pool of sera from these three groups resulted in detection of immunogenic proteins that were classified into two clusters according to their intensity of immunogenicity: the four major bands with high immunogenicity (37, 54, 60, and 150 kD) and four minor bands with low immunogenicity (90, 95, 110, and 125 kD). We observed a similar immunologic profile for these two clusters in the three exposed groups. This resulted in detection of common salivary proteins that are immunogenic in all groups exposed to *G. fuscipes fuscipes* bites regardless of the infection status of the patients. However, some variations in detection of immunogenic proteins were observed between the ENI and P1/P2 groups. The IgG response to smaller salivary proteins (four bands between 37 kD and 42 kD) was detected only in the ENI group. This suggests that the immunogenicity of some salivary proteins decreases with the infection status of sleeping sickness (exposed versus infected), which could be due to immunosuppression observed during development of sleeping sickness.³⁴

Analysis of the immunologic profile of exposed (ENI group) and infected (P1 group) individuals also confirmed group-dependent differences according to the exposed versus infected status. The ENI group showed heterogeneity in immunogenic profiles between individuals, which suggested that exposed but non-infected individuals have a different immune response to *Glossina* salivary proteins. In contrast, the immunogenic profile was similar among infected P1 individuals for whom three major bands (37, 60, and 150 kD) with high immunogenicity were commonly detected.

Since the mid 1990s, several studies have investigated the immune response of mammalian hosts to arthropod bites.³⁵ Qualitative and quantitative evaluation of specific human antibody responses to arthropod salivary proteins may be a useful marker of exposure to vector-borne diseases, similar to markers for malaria in Senegal and for Chagas disease and visceral leishmaniasis in Brazil.^{12,16,17}

Selection of immunogenic proteins for elaboration of an immune marker of exposure to *Glossina* requires knowledge of vector saliva composition in proteins (sialome) and immunogenic characteristics of these proteins (immuno-sialome). Candidate proteins must be expressed in saliva of most *Glossina* species, or at least be common to vector *Glossina* species.

In several hematophagous species, the male does not take a blood meal, which is reflected in salivary morphology and secretions.³⁶ Both female and male *Glossina* could be vectors of *Trypanosoma*, and we have shown that both sexes have similar immunogenic profiles of salivary proteins. Since the observed immune response must be specific to *Glossina* salivary antigens, the protein containing potential common epitopes with other vector arthropods would have to be eliminated from the pool of candidate proteins. Furthermore, immunogenic proteins specific to a *Glossina* species (42 kD for *G. fuscipes fuscipes* and 50, 55, 65, and 72 kD for *G. morsitans morsitans* in our study) should also be markers of distinguishing specific exposure to the bite of one *Glossina* species.

Candidate proteins should have immunogenic properties enabling detection of specific antibodies in all persons exposed to *Glossina* bites, whether or not the persons are infected. Several immunogenic proteins of interest were emphasized in our results. Major proteins were identified in ENI and P1 individuals, including 37-, 60-, and 150-kD bands. However, these bands, except for the 37-kD band, also appeared to be immunogenic in the unexposed CHU group but their immunogenicity was low. Among the minor proteins, only the 110-kD protein was immunogenic in most individuals exposed to *Glossina* bites, but it showed weak immunogenicity in our study. We have not identified a marker protein, and our results represent a first attempt to characterize the immunogenic profile of *Glossina* salivary proteins in an exposed population. Nevertheless, this study indicates the feasibility of elaboration of an immuno-epidemiologic marker of exposure based on antibody response to salivary proteins.

Further studies on other sleeping sickness transmission foci are needed to confirm these results. The immuno-proteomic approach using two-dimensional electrophoresis could identify immunogenic proteins specific for exposure to *Glossina* bites and could be used for mass spectrometric characterization of proteins. After immunogenic proteins are identified, selected proteins could be produced in their recombinant form and a quantitative method (enzyme-linked immunosorbent assay) could be used to evaluate specific individual antibody titers to these proteins in the framework of large-scale immuno-epidemiologic studies. These immunologic results could be compared with exposure (as evaluated by an entomologic approach) and morbidity data.

The development of an immuno-epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites could represent a tool complementary to those currently available, which include diagnostic tests enabling evaluation of morbidity and environmental data (satellite data, climate models, entomologic information, and cartography) that define where and when populations have been exposed to vectors and parasites.³⁷ Such a marker could be used to estimate the exposure of individuals to *Glossina* bites and be an indicator of risks of HAT transmission.

Received May 31, 2006. Accepted for publication July 31, 2006.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge the population of the Bandundu area for participation in the study. We thank G. Cuny for access to tsetse flies bred in an insectarium, A. M. Dupuy and the occupational health team of Lapeyronie Hospital (Montpellier, France) for access to negative sera from personnel who had never been to Africa; and J. P. Brizard for access to the densitometer.

Financial support: The study in the Democratic Republic of Congo was supported by the Institut de Médecine et Epidémiologie Afri-

caine and the Institut de Recherche pour le Développement. Sylvie Cornélie holds a fellowship from the French Fonds Inkerman and the Fondation Singer Polignac, David Courtin holds a fellowship from the French Fondation des Treilles.

Authors' addresses: Anne Poinssignon, Sylvie Cornélie, and Francois Simondon, Epidémiologie and Prévention, Unité de Recherche 024, Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier CEDEX 5, France, Telephone: 33-4-67-41-63-32, Fax: 33-4-67-41-63-30, E-mails: anne.poinssignon@mpl.ird.fr, cornelie@mpl.ird.fr, and francois.simondon@mpl.ird.fr. Franck Remoue, Epidémiologie and Prévention, Unité de Recherche 024, Institut de Recherche pour le Développement Dakar, Routes des Pères Maristes, BP 1386, 18524 Dakar, Senegal, Telephone 221-849-3555, Fax: 221-832-4307, E-mail: remoue@ird.sn. Pascal Grébaut, Laboratoire de Recherche et de Coordination contre les Trypanosomoses, Centre de Coopération International de Recherche Agronomique pour le Développement, Institut de Recherche pour le Développement, Unité Mixte de Recherche 177, Interactions Hôtes-Vecteurs-Parasites dans les Trypanosomoses, TA 207 G, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier CEDEX 5, France, Telephone and Fax: 33-4-67-59-39-25, E-mail: pascal.grebaut@mpl.ird.fr. David Courtin, Unité de Recherche 010, Institut de Recherche pour le Développement, Santé de la Mère et de l'Enfant en Milieu Tropical, Faculté de Pharmacie, 4 Avenue de L'Observatoire, 75270 Paris, France, Telephone: 33-1-53-73-96-17, Fax: 33-1-53-73-96-17, E-mail: d.courtin@gmail.com. Andre Garcia, Institut de Recherche pour le Développement Benin, La Résidence Les Cocotiers 08, BP 841 Cotonou, Benin, Telephone: 229-21-30-98-21, Fax: 229-21-95-45-51-14, E-mail: andre.garcia@ird.fr.

REFERENCES

- Boa YF, Traore MA, Doua F, Kouassi-Traore MT, Kouassi BE, Giordano C, 1988. The different present-day clinical picture of human African trypanosomiasis caused by *T. b. gambiense*. Analysis of 300 cases from a focus in Daloa, Ivory Coast. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 81: 427-444.
- World Health Organization, 1998. Control and surveillance of African trypanosomiasis. Report of a WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 881: 1-114.
- van Nieuwenhove S, Betu-Ku-Mesu VK, Diabakana PM, Declercq J, Bilenge CM, 2001. Sleeping sickness resurgence in the DRC: the past decade. *Trop Med Int Health* 6: 335-341.
- World Health Organization, 2006. Human African trypanosomiasis. *Wkly Epidemiol Rec* 8: 69-80.
- Hervouet JP, Laveissière C, 1987. Facteurs humains dans la transmission de la maladie du sommeil. *Med Trop Nella Coopération Allo Sviluppo* 3: 72-78.
- Laveissière C, Sane B, Meda HA, 1994. Measurement of risk in endemic areas of human African trypanosomiasis in Côte d'Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 645-648.
- Kuzoe F, Schofield C, 2005. *Strategic Review of Traps and Targets for Tsetse and African Trypanosomiasis Control*. Geneva: World Health Organization. TDR/IDE/TRY/05.1.
- Ribeiro JM, Francischetti IM, 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 48: 73-88.
- Remoue F, Cornélie S, NGom A, Boulanger D, Simondon F, 2005. Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases. Garraud O, ed. *Update in Tropical Immunology*. Herala, India: Transworld Research Network, 377-400.
- Schwartz BS, Ribeiro JM, Goldstein MD, 1990. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132: 58-66.
- Lane RS, Moss RB, Hsu YP, Wei T, Mesirov 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.
- 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.
- Palosuo K, Brummer-Korvenkontio H, Mikkola J, Sahi T, Reunala T, 1997. Seasonal increase in human IgE and IgG4 anti-

- saliva antibodies to *Aedes* mosquito bites. *Int Arch Allergy Immunol* 114: 367-372.
14. Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Palosuo K, Miyani 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: 366-371.
15. Konishi E, 1990. Distribution of immunoglobulin G and E antibody levels to salivary gland extracts of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in several age groups of a Japanese population. *J Med Entomol* 27: 519-522.
16. 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.
17. 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: 363-370.
18. Gordon R, Crewe W, 1948. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse flies obtain their blood meals, 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: 334-356.
19. Ellis JA, Shapiro SZ, ole Moi-Yoi O, Moloo SK, 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: 661-667.
20. Penchenier L, Terrasse C, Diallo BP, Eouzan JP, 1986. *Le Contact Homme-Glossine: Réactions Immunitaires à la Salive de Glossine*. Communication OCCGE no. 27/IRTO/RAP/84. Bouake, Côte d'Ivoire: Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose.
21. Courtin D, Jamonneau V, Mathieu J-F, Koffi M, Milet J, Yemina CS, Kumeso VK, Cuny G, Bilengue CM, Garcia A, 2006. Comparison of cytokine plasma levels in human African trypanosomiasis. *Trop Med Int Health* 11: 647-653.
22. Magnus E, Vervoort T, van Meirvenne N, 1978. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. B. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 58: 169-176.
23. van Meirvenne N, Magnus E, Buscher P, 1995. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop* 60: 189-199.
24. Gidudu AM, Cuisance D, Reifenberg JM, Frezil JL, 1995. Improving the salivation technique in the tsetse fly for the detection of infective metatrypanosomes: study of the effect of biologic and non-biologic factors in the probing behavior of the tsetse fly. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 48: 153-160.
25. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M, 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-858.
26. Cappello M, Bergum PW, Vlasuk GP, Furnidge BA, Pritchard DI, 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: 475-480.
27. Aksoy S, Berriman M, Hall N, Hattori M, Hide W, Lehane MJ, 2005. A case for a *Glossina* genome project. *Trends Parasitol* 21: 107-111.
28. 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: 859-864.
29. Volf P, Rohousova I, 2001. Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122: 37-41.
30. Brummer-Korvenkontio H, Palosuo T, Francois G, Reunala T, 1997. Characterization of *Aedes communis*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* mosquito saliva antigens by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol* 112: 169-174.
31. Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL, Ribeiro JM, 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 194: 331-342.
32. Cheng Q, Aksoy S, 1999. Tissue tropism, transmission and expression of foreign genes in vivo in midgut symbionts of tsetse flies. *Insect Mol Biol* 8: 125-132.
33. Boyle MDP, 1990. *Bacterial Immunoglobulin Binding Proteins*. San Diego CA, ed. San Diego: Academic Press.
34. Vincendeau P, Okomo-Assoumou MC, Semballa S, Fouquet C, Daulouede S, 1996. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Med Trop* 56: 73-78.
35. Schoeler GB, Wikel SK, 2001. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 755-771.
36. James AA, 1994. Molecular and biochemical analysis of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bull Inst Pasteur* 92: 133-150.
37. Thomson MC, Connor SJ, 2000. Environmental information systems for the control of arthropod vectors of disease. *Med Vet Entomol* 14: 227-244.

Résumé des travaux

L'objectif de cette étude était de détecter et de comparer la composition en protéines salivaires immunogéniques de quatre espèces de glossine, espèces vectrices ou non de *T. b. gambiense*, chez des individus, infectés ou non, résidant en zone endémique. Par une technique d'immuno-empreinte, nous avons remarqué que la composition de la salive en protéines immunogéniques était dépendante de l'espèce glossinienne (vectrice ou non) et que leur immunogénicité était dépendante du statut d'exposition (exposé ou non) et infectieux (infecté ou non) des individus. Cette étude nous a permis de détecter des protéines salivaires immunogéniques spécifiques ou communes entre les espèces de glossine. Trois 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 pourraient être de possibles candidats pour l'élaboration d'un marqueur immuno-épidémiologique appréciant l'exposition aux espèces des glossines.

Parallèlement à cette étude initiée en 2004, des équipes belges ont publié des travaux explorant l'immunogénicité de la salive de *G. morsitans morsitans* (Caljon *et al.* 2006). Ces études ont permis de détecter des protéines salivaires immunogéniques au sein de la salive de *G. morsitans morsitans* chez des personnes, infectées ou non par *T. b. rhodesiense*, résidant en Ouganda et exposées aux piqûres de ces glossines sylvicoles. Une réponse IgG a été détectée contre 3 groupes de protéines, de fort (130-170 kDa), de moyen (57-58 et 64-66 kDa) et de faible poids moléculaire (28 kDa). Une réponse IgG contre les protéines Tsal-1 et -2 (43-45 kDa) a également été retrouvée chez tous les individus exposés.

Dans le cadre de notre étude d'immuno-détection, nous n'avons pas observé le même profil de protéines salivaires immunogéniques pour la salive de *G.m.m.* et notamment les protéines Tsal-1 et -2 qui apparaissent très immunogéniques chez les personnes ougandaises. Cette espèce de glossine ne semble pas être retrouvée dans la zone de Bandundu (Figure 37) et on ne détecte pas de réponse IgG spécifique contre ces protéines chez les individus. Par ailleurs, des gènes codants pour Tsal-1/-2 ont été retrouvés chez *G. fuscipes* (Li *et al.* 2001). Les individus de Bandundu sont exposés aux protéines salivaires de *G.f.f* dont Tsal-1 et -2 et en effet ils semblent développer une réponse immune IgG spécifique à des protéines d'un poids moléculaire proche de 42kDa pouvant correspondre à ces 2 protéines. La présence d'épitopes différents entre ces protéines chez les 2 espèces de glossine pourrait expliquer que les

personnes de Bandundu ne développent pas d'IgG reconnaissant les protéines Tsal-1/-2 spécifiques de *G.m.m.*.

Ces observations soulignent l'importance de valider des candidats marqueurs dans différentes zones géographiques présentant des contextes d'exposition différents.

Suite à ces deux études, cette thématique appliquée aux glossines a été arrêtée au sein du projet EpiVect. Néanmoins notre équipe EpiVect reste associée à l'initiation et aux suivis des résultats d'un projet concernant la salive des glossines intitulé « Etudes expérimentales de la réponse anti-salive de glossines chez les bovins d'Afrique de l'ouest : application à l'analyse de la trypanotolérance et à l'évaluation de l'exposition des troupeaux » qui a été accepté pour financement dans le cadre de projets Aires-Sud. Cette étude vise à développer un marqueur séro-épidémiologique, basé sur la détection d'anticorps dirigés contre la salive de glossine pour l'analyse de la trypanotolérance chez les bovins et l'évaluation de l'exposition des troupeaux pour les études et le contrôle des trypanosomiasés animales africaines. Par ailleurs cette étude se propose d'étudier les effets immunomodulateurs de cette salive sur la réponse immune de l'hôte et l'établissement de l'infection par *Trypanosoma congolense*. Elle s'intéresse principalement à la mouche tsé-tsé de l'espèce *Glossina palpalis palpalis* en raison de son abondance relative en Afrique de l'ouest par rapport aux autres espèces et de son rôle de vecteur commun des trypanosomoses animales africaines et de la trypanosomiasé humaine africaine. Les coordinateurs principaux sont le Dr. Zakaria Bengaly, chercheur au Centre International de Recherche-Développement sur l'Elevage en zone Subhumide (CIRDES-Bobo-dioulasso, Burkina Faso) et le Dr Bruno Bucheton, chercheur au sein de l'IRD-UR177 affecté au CIRDES. Dans ce cadre, un transfert de technologie concernant les techniques de salivation et d'immuno-protéomique a eu lieu en janvier 2008 au CIRDES.

Chapitre 2

*Développement d'un marqueur immuno-
épidémiologique d'exposition spécifique à
*Anopheles spp.**

Dans le cadre du paludisme, le concept de développer des marqueurs d'exposition à partir de l'évaluation de la réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* a préalablement été démontré au sein de notre laboratoire. En effet, des enfants résidant dans une région impaludée au Sénégal développaient une réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* dont l'intensité était associée positivement à leur degré d'exposition aux piqûres de ce vecteur, évalué par des méthodes entomologiques classiques (Remoue *et al.* 2006). L'évaluation quantitative du taux d'Ac spécifiques aux protéines salivaires d'*An. gambiae* pourrait donc être un moyen d'apprécier l'exposition individuelle aux piqûres de ce vecteur et de ce fait au risque de transmission du paludisme. Cette première étude a été confirmée pour un autre complexe pathogène (*An. dirius/P. falciparum*) en Thaïlande (Waitayakul *et al.* 2006).

Dans l'objectif de développer un marqueur spécifique de l'exposition à *Anopheles spp.*, nous avons orienté nos recherches vers l'identification de protéines salivaires spécifiques au genre *Anopheles* ce qui nous a conduits à valider un peptide salivaire dérivé de la protéine gSG6 en tant que candidat potentiel chez des enfants vivant en zone de transmission palustre saisonnière au Sénégal. Dans un deuxième objectif, nous avons évalué l'acquisition des réponses immunes IgG et IgM spécifiques à un candidat marqueur, identifié lors de la première étude, chez des très jeunes enfants au cours de leurs deux premières années de vie dans une autre zone de transmission saisonnière au Sénégal.

2.1 - Épidémiologie du paludisme au Sénégal

Les premières descriptions de cas de paludisme au Sénégal sont rassemblées dans l'"essai sur les fièvres intermittentes pernicieuses observées à la côte occidentale" écrit en 1850 par Pierre Hippolyte Vivien. Ces descriptions précèdent l'identification de l'agent causal par Charles Louis Alphonse Laveran en 1880 et la découverte du mode de transmission par Ronald Ross en 1897.

D'après le programme national de lutte contre le paludisme (PNLP) du Sénégal, le paludisme constitue actuellement le problème majeur de santé publique du pays. Il constitue la première cause de morbidité et de mortalité, d'après le PNLN plus de 8000 décès par an sont attribués directement à cette parasitose. Le paludisme sévit à l'état endémique dans tout le Sénégal, toutefois son épidémiologie est caractérisée par l'hétérogénéité des niveaux d'endémicité et

des modalités de transmission (Figure 40). La transmission est particulièrement intense dans les zones rurales, là où l'accès aux soins est le plus limité.

La transmission du paludisme est essentiellement de type saisonnier au cours de la saison des pluies jusqu'au début de la saison sèche. Le principal parasite est à 90% *P. falciparum*, 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; Faye *et al.* 1993).

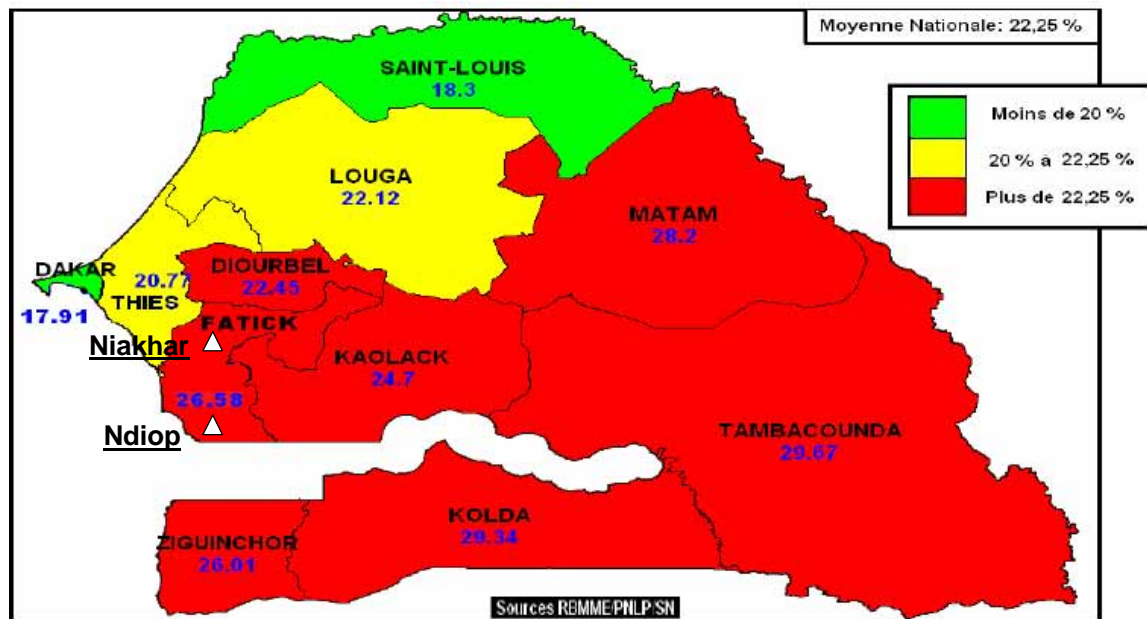


Figure 40. Prévalence de la morbidité palustre en fonction des régions au Sénégal en 2007. Les villages de Niakhar et de Ndiop sont indiqués.
D'après PLNP Sénégal.

Les caractéristiques de l'endémicité sont spécifiques aux zones géographiques. 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.

Le peuplement anophélien du Sénégal est riche d'une vingtaine d'espèces. Le rôle de vecteur du paludisme humain a été établi chez quatre d'entre elles dont trois espèces du complexe *Anopheles gambiae* (*An. gambiae* s.s; *An. arabiensis*; *An. melas*) et *Anopheles funestus*. Des vecteurs secondaires ont également été identifiés comme *An. pharoensis* et *An. nili*. La distribution d'*An. gambiae* s.s et *An. arabiensis* est symétrique dans tout le pays et leur

fréquence relative est fonction des conditions climatiques. *An. arabiensis* est mieux représentée dans les savanes sèches (zones sahéliennes et soudano-sahéliennes), alors qu'*An. gambiae* s.s prédomine dans les zones de savane humide, bien qu'elle soit également rencontrée dans la zone sahélienne, le long du fleuve Sénégal et sur le littoral. La disponibilité en eau, suite à une bonne pluviométrie et/ou une bonne maîtrise des eaux de surface, est à l'origine de la prolifération durable des vecteurs, de l'apparition ou du retour de certaines espèces de vecteurs qui avaient plus ou moins disparu. L'un des vecteurs principaux *An. funestus* s'était raréfié au nord du pays mais récemment une étude a montré son rôle dans la transmission du paludisme dans la région du fleuve Sénégal (Dia *et al.* 2008). La réintroduction de cette espèce peut notamment être attribuée à la mise en place de deux barrages hydrauliques qui ont modifié les pratiques maraîchères de la région, créant de nouveaux gîtes pour cette espèce anophélienne. Ainsi cette recolonisation par *An. funestus* semble avoir démarré après les sécheresses des années 1970-1990 (Konate *et al.* 2001).

La première étude présentée ici a été menée à Niakhar, une zone rurale du centre Sénégal située à environ 135 km de Dakar. L'ethnie majoritaire est Sérère. La densité de population est forte (en moyenne 126 habitants/km²); tout l'espace est anthropisé dans le but de favoriser les activités agricoles. Le paysage, dont l'absence de relief, est marqué par les concessions qui constituent l'unité traditionnelle d'habitation pour une famille avec plusieurs maisons à murs de terre sèche et un toit habituellement en paille, plus rarement en tôle ondulée, ordinairement perméables aux entrées-sorties des moustiques. Ces concessions sont dispersées au milieu des champs de culture de petit mil et d'arachide. Le bétail bovin, ovin, caprin, équin et la volaille est bien représenté. Mis à part les bovins en saison sèche, tous ces animaux passent la nuit dans les concessions. L'usage des moustiquaires de lit est très limité. Le climat de type sahélien est caractérisé par l'alternance d'une longue saison sèche de novembre à juin et d'une saison pluvieuse de juillet à octobre. Quelques marigots ou mares sont mis en eau par les pluies et s'assèchent rapidement dès le début de la saison sèche. Au cours de la période 1982–96 la moyenne pluviométrique a été de 437 mm dont 75% d'août à septembre (en quantité d'eau comme en nombre de jours pluvieux).

Dans la zone de Niakhar les vecteurs majeurs sont *An. arabiensis* (97%) et *An. gambiae* s.s. et *P. falciparum* est la seule espèce plasmodiale responsable du paludisme. La transmission est saisonnière essentiellement en saison des pluies (pic en septembre-octobre) et présente des variations locales en durée et en intensité. Elle correspond globalement à un paludisme méso-endémique (EIR=10). L'épidémiologie du paludisme dans la zone de Niakhar apparaît liée

aux particularités écologiques spécifiques de chacun des villages étudiés (Robert *et al.* 1998). En effet il existe des disparités de transmission entre les différents villages composant cette zone.

La deuxième étude présentée dans ce chapitre a été menée à Ndiop, un village situé à 280 km de Dakar, dans la région du Saloum. Les ethnies majoritaires sont les Wolof et les Peuhl. La végétation est constituée de savane arborée et les principales cultures sont les arachides et le petit mil. La saison des pluies s'étend de juin à octobre. Au cours de la période 1993–96 la moyenne pluviométrique a été de 673 mm. Les vecteurs majeurs du paludisme sont *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* et *P. falciparum* est le seul parasite responsable du paludisme (Fontenille *et al.* 1997). La transmission est saisonnière essentiellement en saison des pluies et correspond globalement à un paludisme méso-endémique (EIR=20).

2.2 - Identification du peptide gSG6-P1 comme marqueur immunologique d'exposition spécifique aux piqûres d'*Anopheles gambiae*

Cette étude a été initiée en collaboration avec José Ribeiro (National Institute of Health, Bethesda, USA) et Bruno Arcà (Université de Rome et de Naples, Italie), suite à une réunion avec le groupe EpiVect à Montpellier en juin 2006.

L'objectif principal de cette étude était d'identifier et de tester des protéines salivaires spécifiques d'*Anopheles spp.* pouvant être des candidats pertinents pour l'élaboration d'un marqueur immuno-épidémiologique d'exposition spécifique aux piqûres de ces vecteurs. En effet, un marqueur d'exposition optimal devra évaluer spécifiquement le degré d'exposition des populations humaines aux espèces *Anopheles* ou à un ensemble d'espèces d'*Anopheles* vectrices mais ne doit pas estimer simultanément l'exposition à d'autres insectes hématophages tels que les *Aedes*, *Culex*, *Glossina*, etc. De tels phénomènes de réactivité immunologique croisée peuvent être attendus du fait que certaines protéines salivaires d'arthropodes sont retrouvées de manière ubiquitaire au sein de la salive de plusieurs espèces d'insectes (l'apyrase par exemple).

Parmi les protéines salivaires sécrétées identifiées par les études sur le transcriptome des glandes salivaires de plusieurs espèces d'*Anopheles*, la famille des protéines Salivary Gland (SG) a été identifiée spécifique aux *Anophelinae* (Valenzuela *et al.* 2003). Cette famille est composée de 8 protéines (SG1-SG8) qui ont été identifiées la première fois chez *An.*

gambiae (Arca *et al.* 1999). Ces protéines n'ont pas de fonction connue actuellement mais leurs séquences présentent clairement un peptide signal suggérant que ces protéines sont sécrétées au sein de la salive et donc interviennent dans la relation homme-vecteur.

Les gènes codants pour gSG6 et gSG7 (g signifie que la séquence est celle d'*An. gambiae*) présentent des faibles homologies de séquence avec des protéines anti-coagulantes du nématode hématophage *Ancylostoma caninum* et du venin du cobra chinois *Naja naja atra* respectivement (Lanfrancotti *et al.* 2002). *A. caninum* infecte de nombreux vertébrés et se nourrit en dilacérant les vaisseaux de l'intestin de l'hôte. Pour prévenir l'hémostase ce parasite sécrète des protéines nommées AcAPs (*A. caninum* anti-coagulant proteins) qui inhibent le facteur Xa et le complexe VIIa-Facteur Tissulaire de la cascade de coagulation (Stassens *et al.* 1996). La protéine gSG6 présente un fort degré de similarité avec la protéine AcAPs6 (24% identité et 65% de similarité). La protéine gSG7 présente un faible degré de similitude avec une phospholipase PLA2 qui est retrouvée au niveau du venin du cobra chinois (19% d'identité et 45% de similarité) et qui présente une activité d'inhibition sur le facteur Xa (Pan *et al.* 1994). Ces similarités avec des molécules anticoagulantes d'espèces distantes n'impliquent pas nécessairement des fonctions homologues mais la coïncidence est à noter. En effet les études précédentes ont montré que la salive des anophèles contenait des protéines ayant une action directe sur la thrombine mais n'ont pas reporté d'action contre le facteur Xa (Valenzuela *et al.* 1999). Le poids moléculaire de gSG6 est d'environ 13kDa et sa séquence comporte 10 résidus cystéine probablement à l'origine de cinq ponts di-sulfure.

En complément il a été observé 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.* 2006). Par ailleurs, la quantité de protéine gSG6 est moindre chez un vecteur infecté (Choumet *et al.* 2007).

La protéine SG6 a également été retrouvée au niveau des glandes salivaires d'*An. stephensi* et *An. funestus* mais non chez *An. darlingi*. La figure 41 présente les séquences de la protéine SG6 chez ces trois espèces d'anophèles.

E. Calvo et al. / Insect Biochemistry and Molecular Biology 37 (2007) 164–175

```

AS_SG6  MATFVALLLTMLLPVLLQTSQ-PYAAAEKVWDRDKVYCEHIICTRVATYKGERFCS 57
AF_SG6  MAMFVELLLAMVLLPIVLQVGG-PYATAEKVWDRDQVYCEHIICTRVATFKGERFCS 57
AG_SG6  MAIRVELLLAMVLLPLLLLESVVPAAAEKVWDRDNVYCEHIICTRVATFKGERFCT 58
      **  *  ***:*****:*  .  *:*:*****:***  *:*****:*****:

AS_SG6  ECOTRHFCCKETKESLPYMYNCPGTECCQTSDDRGSCQQTMSDEICSRIDQAFLEA 113
AF_SG6  ECOTRHFCCKETKESLPYMYNCPGTECCQTSDDRGTCQKTMHDEICKLIDKPFLEQ 113
AG_SG6  ICOTRHFCCKETREPLPYMYNCPGTECCQSSDRLGSCSKSMHDVLCRIDQAFLEQ 114
      *****  *:*****  *****  *:***  *:~::~*  **_  **:~***
    
```

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).

Par ailleurs, la protéine gSG6 a été rapportée antigénique chez des individus (militaires en mission en Afrique) faiblement exposés aux piqûres d'*Anopheles* (Orlandi-Pradines *et al.* 2007), ceci ayant été confirmé par notre équipe chez des enfants vivant en zone endémique à Niakhar (S. Cornélie, communication personnelle). La protéine gSG6 présente les caractéristiques de spécificité et d'immunogénicité nécessaires, elle se présentait comme le meilleur candidat marqueur d'exposition.

Deux protéines de la famille des protéines SG, gSG6 et gSG7, ont été synthétisées sous forme recombinante dans un système levure (*Pichia pastoris*) par l'équipe de Bruno Arcà. À notre connaissance elles représentaient les seules protéines salivaires SG disponibles sous forme recombinante. Nous avons donc saisi l'opportunité de tester l'immunogénicité de ces deux protéines recombinantes. Mais des problèmes de rendement dans la production de ces protéines recombinantes nous ont restreint à tester ces protéines recombinantes chez un petit nombre d'enfants.

Immunogénicité des protéines recombinantes gSG6 et gSG7

Nous avons évalué la réponse IgG spécifique à ces deux protéines salivaires chez six enfants résidant en zone d'endémie palustre à Niakhar au Sénégal (Figure 42). Ces enfants ont été sélectionnés sur la base de leur forte réponse IgG anti-salive totale (Remoue *et al.* 2006).

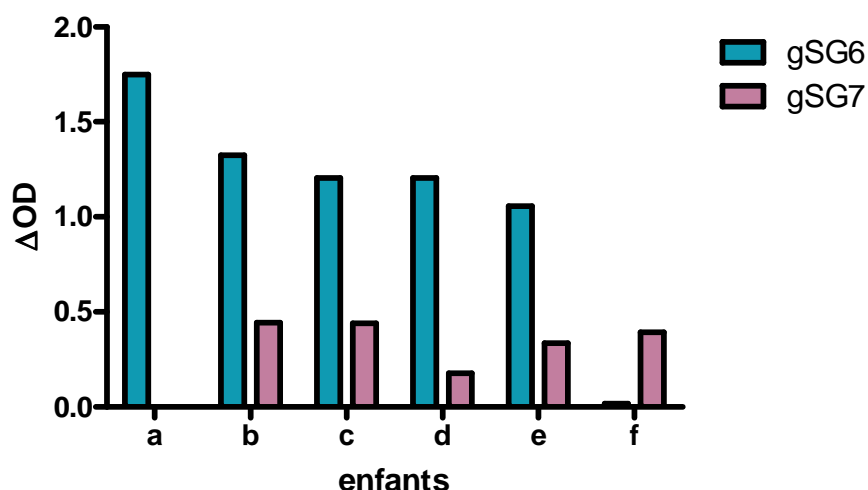


Figure 42. Evaluation de l'immunogénicité des protéines gSG6 et gSG7 recombinantes chez 6 enfants (a-f) résidant en zone de transmission palustre à Niakhar (Sénégal).

Les enfants présentaient un plus fort niveau d'Ac IgG contre la protéine gSG6 que pour gSG7. La protéine gSG7 semblait faiblement antigénique. Nous avons donc orienté notre étude exclusivement sur gSG6 répondant au premier critère d'un marqueur d'exposition: l'antigénicité.

Comme indiqué précédemment, des problèmes de rendement et de reproductibilité des lots dans la production de gSG6 sous forme recombinante nous ont amenés à développer une stratégie peptide consistant à définir des peptides à partir de la séquence de gSG6 par des outils de bio-informatique, de tester leur immunogénicité et de comparer le niveau de réponse IgG spécifique à ces peptides chez des enfants résidant en zone palustre à Niakhar en fonction de leur niveau d'exposition, évalué par des techniques entomologiques.

Nous nous sommes aperçu de l'intérêt de cette démarche peptidique pour répondre à un des autres critères principaux d'un candidat marqueur: la spécificité. En effet, on augmente la spécificité à *Anopheles spp.* en travaillant sur des peptides de courte séquence aminée plutôt que sur une protéine entière.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans PLoS ONE, qui est présentée ci-dessous.

Poinsignon A., Cornélie S., Mestres-Simon M., Lanfrancotti A., Rossignol M., Boulanger D., Cisse B., Sokhna C., Arcà B., Simondon F. et Remoue F. 2008. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles bites*. PLoS ONE 3 (6): e2472.

Novel Peptide Marker Corresponding to Salivary Protein gSG6 Potentially Identifies Exposure to *Anopheles* Bites

Anne Poinssignon^{1*}, Sylvie Cornélie², Montserrat Mestres-Simon³, Alessandra Lanfrancotti³, Marie Rossignol², Denis Boulanger², Badara Cissé^{4,5}, Cheikh Sokhna⁴, Bruno Arcà^{3,6}, François Simondon², Franck Remoue²

1 UR024-Epidémiologie et Prévention, IRD (Institut de Recherche pour le Développement), Dakar, Sénégal, **2** UR024-Epidémiologie et Prévention, IRD, Montpellier, France, **3** Department of Public Health, Parasitology Section, Sapienza University, Rome, Italy, **4** UR077-Paludologie Afro-tropicale, Dakar, Sénégal, **5** Département de Parasitologie, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal, **6** Department of Structural and Functional Biology, University Federico II, Naples, Italy

Abstract

Background: In order to improve malaria control, and under the aegis of WHO recommendations, many efforts are being devoted to developing new tools for identifying geographic areas with high risk of parasite transmission. Evaluation of the human antibody response to arthropod salivary proteins could be an epidemiological indicator of exposure to vector bites, and therefore to risk of pathogen transmission. In the case of malaria, which is transmitted only by anopheline mosquitoes, maximal specificity could be achieved through identification of immunogenic proteins specific to the *Anopheles* genus. The objective of the present study was to determine whether the IgG response to the *Anopheles gambiae* gSG6 protein, from its recombinant form to derived synthetic peptides, could be an immunological marker of exposure specific to *Anopheles gambiae* bites.

Methodology/Principal Findings: Specific IgG antibodies to recombinant gSG6 protein were observed in children living in a Senegalese area exposed to malaria. With the objective of optimizing *Anopheles* specificity and reproducibility, we designed five gSG6-based peptide sequences using a bioinformatic approach, taking into consideration i) their potential antigenic properties and ii) the absence of cross-reactivity with protein sequences of other arthropods/organisms. The specific anti-peptide IgG antibody response was evaluated in exposed children. The five gSG6 peptides showed differing antigenic properties, with gSG6-P1 and gSG6-P2 exhibiting the highest antigenicity. However, a significant increase in the specific IgG response during the rainy season and a positive association between the IgG level and the level of exposure to *Anopheles gambiae* bites was significant only for gSG6-P1.

Conclusions/Significance: This step-by-step approach suggests that gSG6-P1 could be an optimal candidate marker for evaluating exposure to *Anopheles gambiae* bites. This marker could be employed as a geographic indicator, like remote sensing techniques, for mapping the risk of malaria. It could also represent a direct criterion of efficacy in evaluation of vector control strategies.

Citation: Poinssignon A, Cornélie 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(6): e2472. doi:10.1371/journal.pone.0002472

Editor: Niyaz Ahmed, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, India

Received: February 8, 2008; **Accepted:** April 30, 2008; **Published:** June 25, 2008

Copyright: © 2008 Poinssignon 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: Anne Poinssignon was supported by a scholarship provided by the Research Ministry of France. Sylvie Cornélie was supported by the Inkerman Foundation. Alessandra Lanfrancotti was supported by Compagnia di San Paolo-IMI (Torino Italy) and Montserrat Mestres-Simon by the EU-RTN Project ERBFMRXCT2000-00080. This work was supported by the French Ministry of Research (PAL+ Program), the French Ministry of Defense (Délégation Générale pour l'Armement) and the IRD. The malaria field study in Niakhar area was funded by the Gates Malaria Program. This work is part of the activities of the BioMalPar European Network of Excellence supported by a European grant (LSHP-CT-2004-503578) from the Priority 1 "Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health" in the 6th Framework Programme.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: anne.poinssignon@ird.fr

Introduction

The threat from vector-borne diseases, considered to be major public health problems in developing countries, is prompting research and health community in developing new tools for diseases control. Malaria is by far the most severe of these diseases. It is transmitted by the *Anopheles* mosquitoes and is responsible each year for at least 400 million acute cases globally, resulting in more than one and a half million deaths [1]. The vast majority of malaria deaths occur in sub-Saharan Africa and are caused by *Plasmodium falciparum*, the most severe and life-threatening form of

the disease. In these areas the *Anopheles gambiae* complex is the major vector. With a goal toward improving malaria control, the "Roll Back Malaria" partnership has recommended developing new diagnostic tool, especially for identifying geographic areas with high risk of transmission [1]. The evaluation of exposure to malaria risk is currently based on entomological methods (traps, household/indoor spraying, human-landing catches, etc.) but such methods are mainly applicable at the population level and do not enable evaluation of the heterogeneity of individual exposure. Trapping methods using adult volunteers can estimate individual exposure, but may be limited due to ethical constraints

and limitations in terms of extrapolation to the incidence in children [2].

Plasmodium parasites are injected together with saliva during blood-feeding by an infected *Anopheles* female. Salivary proteins play a dual role in facilitating mosquito blood feeding; their pharmacological properties permit to counteract human defenses triggered by dermis disruption (inflammatory and hemostasis) and their immunological properties modulate the immune response of the human host [3,4]. In addition, some salivary proteins are immunogenic and can initiate a specific antibody (Ab) response [5]. Linked to this interesting property, previous studies have shown that the anti-saliva Ab response could be a potential marker of exposure to vector-borne diseases in individuals exposed to bites of arthropod vectors, such as ticks [6], phlebotomies [7], *Triatoma* [8], *Glossina* [9] and also *Aedes* mosquitoes [10]. As concerns *Anopheles* spp. and malaria transmission, early epidemiological studies have shown that individuals living in malaria endemic areas, i.e. exposed to *Anopheles* bites, develop a specific anti-saliva Ab response [11,12]. In Senegal, our group has indeed demonstrated that the IgG response to whole saliva extracts (WSE) of *An. gambiae* represents a marker of exposure to *An. gambiae* bites. In addition, high anti-saliva IgG levels appeared to be a predictive indicator of malaria morbidity [11].

Some families of salivary proteins are widely distributed in bloodsucking *Diptera* [13]. Taking this into account, the evaluation of *Anopheles* exposure based on the immunogenicity of WSE could be skewed and/or overestimated by possible cross-reactivity between common epitopes on immunogenic salivary proteins between mosquito species. An alternative for optimizing the specificity of this immuno-epidemiological test would thus be to identify *Anopheles* genus-specific proteins [14].

In the last decade, biochemical properties and the role played by saliva and salivary glands of arthropods in the permissiveness of transmission of pathogens has become a new research pathway for disease vectors [15,16]. Related to the identification of the arthropod genome, these studies were performed by high throughput transcriptome and proteome analyses based on salivary gland cDNA libraries [17]. In *An. gambiae*, a catalogue including 71 secreted salivary proteins has recently been described [18]. Among these proteins, the so-called Salivary Gland proteins (SG1-8) have been reported to be *Anopheles* spp.-specific and may represent potential candidate for elaborating genus-specific markers of exposure [19].

Furthermore, among these specific proteins, recent data indicated that the gSG6 protein could be immunogenic in individuals exposed to *Anopheles*. Indeed, via an immunoblotting approach, a band with molecular weight corresponding to the gSG6 protein (11–13 kDa) was identified as antigenic in individuals briefly exposed to *Anopheles* bites [20]. In addition, in Senegalese children living in an endemic area for malaria, the gSG6 protein was recently confirmed as being antigenic by a 2D approach coupled with mass spectrometry (Cornelie, unpublished data). Above these 2 criteria, the gSG6 protein would seem to be a relevant candidate for validating its potential as an immunological marker specific to *An. gambiae* bites.

The objective of the present study was to determine whether the IgG Ab response to the *An. gambiae* gSG6 antigen and derived peptides is an immuno-epidemiological marker of exposure specific to *An. gambiae* bites in children living in an endemic area for malaria. Using a step-by-step approach, we investigated i) the antigenicity of gSG6 expressed in recombinant form, ii) the *Anopheles*-specificity and the antigenic potential of gSG6 peptides designed using a bioinformatic approach, and iii) anti-gSG6 peptides IgG levels in exposed children according to *An. gambiae* exposure as estimated by entomological methods.

Materials and Methods

Study population

The present study was conducted in Niakhar, a rural district of central Senegal. This area is characterized by a dry savannah with a rainy season from July to October (approximately 400 mm of rainfall recorded). This area is typical of the Sahel and Sub-Sahel regions of Africa, where the occurrence of malaria is unstable, with a season of *P. falciparum* transmission mainly from September to November [21,22].

Sera were available from a clinical trial on seasonal intermittent preventive treatment for prevention of malaria performed in 2002 in children aged 6 weeks to 5 years [22]. Sera from a subsample of these children were available at the peak (September) and at the end (December) of the rainy season, as previously described [11]; 241 children were screened in September 2002 and, among them, 175 children were screened in both September and December 2002.

Both the trial on anti-malaria treatment and the present study followed ethical principles according to the Edinburgh revision of the Helsinki Declaration, and were approved by the ethical committees of the Ministry of Health of Senegal (August 2002 and May 2003, respectively) and of the IRD (Institute of Research for the Development) (January 2004). The anti-malaria trial was approved by the ethical committee of the London School of Hygiene and Tropical Medicine in June 2002. Written informed consent was obtained from the study population.

Entomological data

Entomological data were collected each month between September and December 2002 in 11 villages in the Niakhar area using capture by light traps (CDC miniature light trap). Analysis of entomological data led to defining 3 groups of individuals classified by their exposure level to *Anopheles gambiae* bites (low, medium and high exposure levels) as previously described [11].

Recombinant protein gSG6

An. gambiae gSG6 was expressed as recombinant protein in the yeast *Pichia pastoris* (Arcà B., unpublished data). cDNA coding for mature gSG6 polypeptide was amplified by RT-PCR using gene-specific oligonucleotide primers. Amplified fragments were directionally cloned in the pPICZα vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) between sequences coding for the signal peptide of the *Saccharomyces cerevisiae* α factor at the N-terminus and those coding for the *c-myc* and polyhistidine tags at the C-terminus. Protein expression was induced by addition of methanol (0.5%) to the medium. After 24–48 hours, supernatants were collected by centrifugation and the proteins were purified by Ni-NTA affinity chromatography according to the manufacturer's instructions (Quiagen, Ontario, Canada). Affinity-purified fractions were employed for the determination of IgG levels by ELISA.

Peptide design of gSG6 salivary protein

We investigated the design of potential immunogenic peptides of the gSG6 protein using bio-informatic tools. The strategy was i) to identify potential immunogenic epitopes predicted by algorithms; and ii) to research the specificity of *An. gambiae* gSG6 peptide sequence compared to the genome/ Expressed Sequence Tag (EST) libraries of other organisms.

This analysis was based on the amino acid sequence of mature *An. gambiae* gSG6 ("UniProtKB/TrEMBL:Q9BIH5" and "gi:13537666", [23]).

The identification of putative linear B-cell epitopes of *An. gambiae* gSG6 was performed by computerized predictions of antigenicity based on physico-chemical properties of the amino-

acid sequences with the BcePred database [24] and with the FIMM database [25]. We also identified the MHC class 2 binding regions using the ProPred-2 online service [26].

Sequence alignments were done with the Tblastn program in Vectorbase database [27] which enabled comparing a sequence of gSG6 peptides with known genomes or EST libraries of *Aedes aegypti*, *Ixodes scapularis*, *Culex pipiens*, *Pediculus humanus*, *Glossina morsitans*, *Rhodnius prolixus*, *Lutzomia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. Concomitantly, we investigated sequence alignments with the Blast program to compare the gSG6 peptides sequence with all non-redundant GenBank CDS database [28].

Peptides were synthesized and purified (>80%) with Genosys (Sigma-Genosys, Cambridge, UK) with an added N-terminal biotin. All peptides were shipped lyophilized and they were resuspended in 0.22 µm filtered milliQ water and stored in aliquots at -80°C.

Evaluation of human IgG Ab levels ELISA

ELISA was carried out using salivary antigens (gSG6 recombinant protein or biotinylated gSG6 peptides) and sera were tested for IgG antibodies. Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with recombinant protein (5 µg/mL) or gSG6 peptides (20 µg/mL for gSG6-P1, gSG6-P5 and 30 µg/mL for gSG6-P2, gSG6-P3, gSG6-P4) in carbonate/bicarbonate buffer. Individual sera were incubated in PBS-Tween 1% (1:10 for assessment on recombinant protein, gSG6-P2 (subsample n<30) and gSG6-P3, and 1:20 for assessment on gSG6-P1, gSG6-P2 (large sample n=241), gSG6-P4 and gSG6-P5). Anti-gSG6 peptides IgG detection was performed using an HRP goat anti-human IgG Ab (1:25000, Nordic Immunology, Tilburg, Netherlands) and anti-recombinant protein IgG detection was performed using a mouse biotinylated mAb (1:1000, BD Pharmingen, San Diego, CA). Peroxidase-conjugated streptavidin (1:1000, Amersham, Les Ulis, France) was added only for assay using biotinylated secondary antibodies. 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% H₂O₂. Absorbance/Optical Density (OD) was measured at 405 nm. In addition, the absence of significant Ab detection was verified in wells without antigen (OD_n). Individual results were expressed as ΔOD value calculated according to the formula ΔOD = OD_x-OD_n, where OD_x represented the individual OD value in antigen wells.

Statistical analysis

All data were analyzed with GraphPad Prism 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 and the non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparison between more than two groups. The Wilcoxon matched pair test was used to compare paired sera between September and December. All differences were considered significant at P<0.05.

Results

Immunogenicity of gSG6 recombinant protein

The IgG response to recombinant gSG6 protein was evaluated in a small sample of children living in the studied area. The children (n=16) chosen for this initial test were selected for their high level of IgG Ab specific to whole *An. gambiae* saliva (0.532<OD_{WSE}<1.499, [11]).

The level of IgG Ab to gSG6 (0.01<ΔOD<1.959) classified according to the intensity of the ΔOD value is presented in Figure 1. A high anti-gSG6 IgG response was observed in half of the children. Interestingly, important variations in the anti-gSG6 IgG level were observed between exposed individuals ranging from a low (Ind. 1–8) or intermediate (Ind. 9) to a high intensity of the Ab level (Ind. 10–15).

Peptide design

The second step was to design gSG6-based peptides with the objective of optimizing and increasing *Anopheles* specificity and reproducibility of the assay, and overcoming limits in production of the recombinant protein and possible batch-to-batch variations.

The identification of potential immunogenic epitopes of the gSG6 protein was done with bioinformatic tools. We employed several algorithms for prediction of potential immunogenic sites (putative linear B-cell epitopes and MHC class 2 binding regions). The crossing of the immunogenic predicted epitopes led us to define 5 gSG6 peptides (gSG6-P1 to gSG6-P5) of 20 to 27 amino acid residues in length, overlapping by at least 3 residues and spanning the entire sequence of the mature gSG6 protein. Both predictive methods for putative linear B-cell epitopes (FIMM and BcePred) assigned the highest potential immunogenicity to gSG6-P1. This peptide was followed in the predicted immunogenicity scale by gSG6-P2 (according to BcePred) or by gSG6-P3 and gSG6-P4 (according to FIMM). Peptide sequences are shown in Figure 2.

In order to try to maximize *Anopheles* specificity and to avoid potential immune cross-reactivity (with proteins from other vector species as well as from pathogens or other organisms), we also searched for similarities using the Blast family programs, including both the genome/EST libraries of other vector arthropods available in Vectorbase and of pathogens/organisms in non-redundant GenBank CDS databases. No relevant similarity was found with proteins of other bloodsucking arthropods, as indicated by the low scores that were obtained (few amino acids consecutively matched and high rate of e-value, i.e. e>0.13). Indeed, the longest perfect match was six amino acids between a putative protein from *Pediculus humanus* and gSG6-P2 and gSG6-P3 peptides (e=0.56). In the case of gSG6-P1, the best match was four amino acids in length with *Culex pipiens quinquefasciatus* salivary adenosine deaminase (e=0.95). Moreover, no relevant similarity

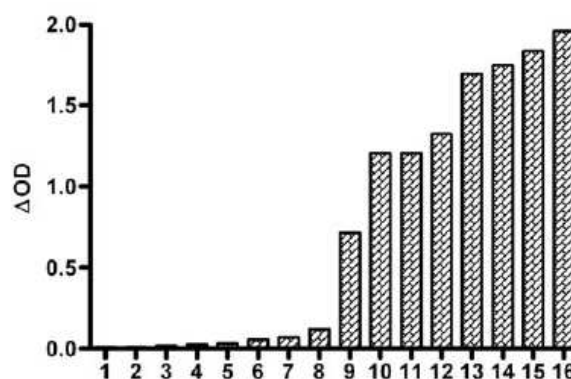


Figure 1. IgG antibody response specific to gSG6 recombinant protein. The IgG antibody level was evaluated in children (n=16) living in an endemic area for malaria. Individual ΔOD results (ΔOD as described in the "Materials and Methods" section) at the peak of the season of *Anopheles* exposure (September) are reported. Samples are ordered according to the intensity of the individual ΔOD value. doi:10.1371/journal.pone.0002472.g001

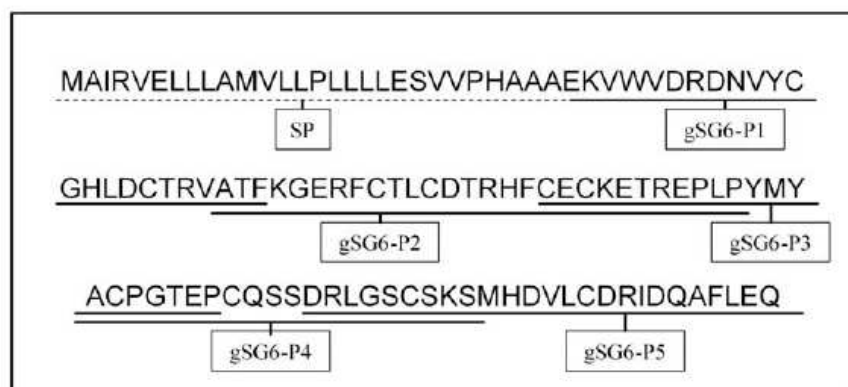


Figure 2. Amino-acid sequence of gSG6 Peptides. Amino-acid sequence of the SG6 protein of *Anopheles gambiae* (gi:13537666) is presented and sequences of the selected peptides, gSG6-P1 to gSG6-P5, are underlined. Signal peptide (SP) sequence is indicating by dotted underline. doi:10.1371/journal.pone.0002472.g002

was found with sequences from pathogens or other organisms. The highest hits of gSG6-P1 were with the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (three amino acids, $e = 2.6$) and with *Ostreococcus* OsV5 virus (four amino acids, $e = 15$).

This analysis confirmed the *bona fide* high specificity of the 5 selected gSG6 peptides for the *Anopheles* species.

Immunogenicity of gSG6 peptides

The following step was carried out to evaluate the IgG Ab response to the five gSG6 peptides by ELISA in a randomly selected subsample of children ($n < 30$) living in the studied area (Figure 3). All peptides were antigenic, but the intensity of the IgG level was clearly peptide-dependent; weak antigenicity was observed for gSG6-P3, gSG6-P4 and gSG6-P5, whereas gSG6-P1 and gSG6-P2 appeared highly antigenic in this subsample of children.

IgG response to gSG6 peptides according to exposure to *An. gambiae* bites

Entomological data led to defining 3 groups of individuals classified by their exposure level (low: 1.29 ± 1.11 ; medium: 16.75 ± 3.18 ; high: 31.08 ± 3.47 bites/human/night, mean \pm SD) as previously described [11]. Therefore, for each gSG6 peptide, we first compared the specific IgG level according to their exposure group, within the same randomly selected subsample of children (data not shown). A positive trend between the specific IgG level and the intensity of exposure was found for gSG6-P1 and for gSG6-P2 in this subsample and this association was only significant for gSG6-P1 ($P < 0.05$). In contrast, gSG6-P3, gSG6-P4 and gSG6-P5 were weakly immunogenic, as also previously mentioned (Figure 3). In addition, the intensity of IgG Ab levels to these 3 peptides was similar whatever the 3 groups of exposure level (data not shown). For all these reasons, the next stage consisted of validating only gSG6-P1 and gSG6-P2 peptides as markers of exposure in a larger immuno-epidemiological analysis according to entomological data. The IgG level specific to gSG6-P1 and gSG6-P2 was then evaluated in children ($n = 241$) according to their exposure group at the peak of the season of *An. gambiae* exposure (September), as defined by entomological data (Figure 4). The IgG response showed significant differences according to exposure groups for both peptides ($P < 0.0001$ for gSG6-P1 and $P = 0.0195$ for gSG6-P2, respectively, Kruskal-Wallis test). The anti-gSG6-P1 IgG level was similar in children in the low and medium exposure groups,

whereas it was significantly higher in children from the high exposure group ($P < 0.0001$ versus both low and medium groups). In contrast, the median anti-gSG6-P2 IgG level appeared closely similar between the low and high groups of exposure (non-significant), although a significant difference ($P < 0.05$) was observed when comparing medium and high groups. In addition, the evolution of the specific IgG antibody response to gSG6-P1 and gSG6-P2 peptides in children ($n = 175$) was evaluated between the peak (September) and the end (December) of the exposure season (data not shown). The specific IgG response was significantly higher in December as compared to September only for gSG6-P1 ($P = 0.0137$, Wilcoxon matched pairs test). Altogether, these results showed that only the IgG response to gSG6-P1 increased with the level of exposure to *An. gambiae*, evaluated by classical entomological data.

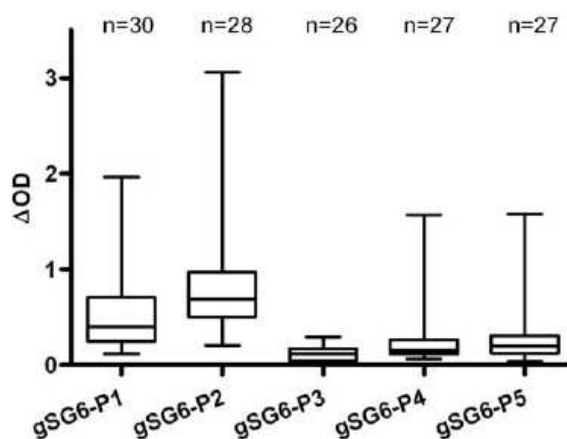


Figure 3. IgG antibody response according to gSG6 peptides. For each gSG6 peptide, the IgG antibody level was evaluated in a subsample of children living in the studied area. Results at the peak of the season of *Anopheles* exposure are reported according to gSG6 peptides. Results are presented by box plot graph where lines of the boxes represent the 75th percentile, median and 25th percentile of individual average ΔOD values; whiskers represent the lower and upper adjacent values. doi:10.1371/journal.pone.0002472.g003

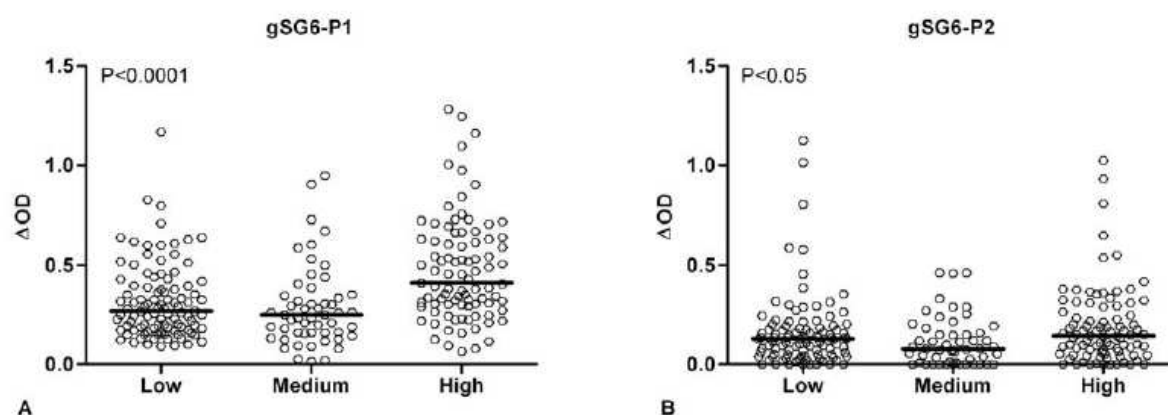


Figure 4. IgG response to gSG6-P1 and gSG6-P2 according to intensity of exposure to *Anopheles gambiae* bites. Individual AOD values in September (peak of the season of *Anopheles* exposure) are shown for the three different exposure groups. Results are presented for the same children (n = 241) for gSG6-P1 (A) and gSG6-P2 (B). Exposure groups were defined by entomological data. Bars indicate median value for each exposure group. Statistical significance between the 3 groups is indicated (non-parametric Mann-Whitney U-test). doi:10.1371/journal.pone.0002472.g004

Discussion

In this present study, the Ab response specific to *Anopheles gambiae* gSG6 salivary protein, from its recombinant form to synthetic peptides, was investigated in children living in a malaria endemic area in Senegal. We have shown for the first time that exposed individuals develop an IgG response to gSG6 protein, with considerable variations among children. With the objective of optimizing *Anopheles* specificity and reproducibility of the immunological assay, a peptide design approach was undertaken using bioinformatic tools. Based on these analyses, five gSG6 peptides were selected for their potential immunogenic properties and for their presumed absence of cross-reactivity (on the basis of identity and similarity) with proteins of other arthropod vectors or pathogens/organisms whose genome or EST libraries are available. The specific IgG level to gSG6 peptides was then evaluated according to the level of exposure as estimated by entomological data. The five gSG6 peptides were antigenic, but the intensity of their specific IgG responses appeared peptide-dependent. Indeed, gSG6-P1 and gSG6-P2 showed the highest level of antigenicity in exposed children, whereas gSG6-P3, gSG6-P4 and gSG6-P5 presented lower levels. This immuno-epidemiological analysis confirmed bioinformatic predictions and enabled us to identify gSG6-P1 and gSG6-P2 as high antigenic peptides. However, only the IgG response to gSG6-P1 increased with the degree of exposure to *An. gambiae* bites, as estimated by classical entomological methods, and in agreement with previous observations of the IgG response to WSE in the same area [11]. Along with the significant increase in anti-gSG6-P1 IgG during the rainy season, these results indicated that the IgG Ab response to gSG6-P1 was positively associated with the exposure to the *An. gambiae* vector. Overall, this step-by-step original approach points to gSG6-P1 as a potential candidate as an immuno-epidemiological marker of exposure to *An. gambiae* bites.

The evaluation of immune responses to salivary components might represent a means for assessing individual exposure to vector bites. Previous studies on malaria vectors investigated the Ab response to *Anopheles* WSE or to salivary gland extracts in individuals living in malaria endemic areas. The specific IgG response to *Anopheles* saliva appeared to be a potential indicator of exposure to vector bites in Senegal [11] and Thailand [12].

Nevertheless, collection of saliva and/or salivary gland extracts is tedious and time-consuming; in addition, saliva composition can be affected by several ecological parameters such as age, feeding status or infectivity of *Anopheles* [29], which in turn may influence the anti-saliva immune response measured in exposed individuals. A further complication lies in the widespread occurrence of some families of salivary proteins in hematophagous arthropod species, which may induce the presence of cross-reactive antibodies in human sera [13]. An ideal alternative would be the availability of a single immunogenic salivary protein specific to a given vector species. This approach has been previously investigated by our team for *Glossina* species, vectors of *trypanosomatidae* [30] and recently for *An. gambiae* [31]. To define an immunological marker of specific exposure to *Anopheles* genus, in terms of specificity, sensitivity and reproducibility, we explored the composition in salivary proteins of different insect vector species among transcriptomic and genomic studies. The gSG6 salivary protein, first described in *An. gambiae* [32], was further reported as being specific to *Anopheles* mosquitoes and highly conserved among *Anopheles* species [19,33]. Indeed, sequence alignment indicated high identity: SG6 of *An. gambiae* shared 75% identity with *An. stephensi* and 76% with *An. funestus* [34]. In addition, the *An. gambiae* gSG6 protein has been reported to be potentially antigenic in travelers exposed for short periods to *Anopheles* bites [20], and it was confirmed as being antigenic in Senegalese children by an immuno-proteomic approach coupling 2D immunoblot and mass spectrometry (Cornelie S., unpublished data). In the present study, we observed that the level of IgG to gSG6 protein was clearly individual-dependent and may represent a tool to discriminate exposure at the individual level. Altogether, these results indicated the strong potential of gSG6 protein as a candidate marker of exposure to *Anopheles gambiae* bites.

The peptide design strategy has strengthened the specificity of markers to *An. gambiae* and in particular, we demonstrated that a single peptide, gSG6-P1 could be the candidate as a marker of exposure. Indeed, this peptide appeared to satisfy several requirements that such an exposure marker should fulfill. First, it thus far appears to be specific to the *Anopheles* genus and therefore, no relevant cross-reactivity phenomena with epitopes from other proteins (main *Diptera* species or pathogens) would be expected. Nevertheless, few vector genomes are currently available

and the clear absence of cross-reactivity will need to be confirmed among other major insect vectors. Second, because it is of a synthetic nature, it guarantees high reproducibility of the immunological assay. Third, it elicits a specific Ab response which correlates well with the level of exposure to *An. gambiae* bites.

In the studied area, the main vector of *Plasmodium falciparum* has been reported to be *An. arabiensis* [11,21], a species belonging to the *An. gambiae* s.l. complex and whose genome is not currently available. gSG6 peptides were designed on the basis of the *An. gambiae* s.s. sequence, the only *Anopheles* genome available [35], which may perhaps result in an under-estimation of the immune response in the studied children, as previously mentioned [11]. Nevertheless, gSG6-P1 shares 82% and 91% identity with *An. stephensi* and *An. funestus*, respectively, two species with greater evolutionary distance from *An. gambiae* s.s. as compared to *An. arabiensis*. The above observation tends to support the notion that gSG6-P1 can be used to evaluate the exposure to other *Anopheles* vectors of malaria. Obviously, confirmation in other transmission areas presenting different malaria transmission modalities is needed. In addition to the applications already mentioned, there exist a number of other useful applications of a marker of exposure to *Anopheles* bites. It will be of interest to evaluate gSG6 peptides in areas with different modalities of transmission, both in term of intensity and of the dynamics of exposure. For example, it would be very useful to identify low exposure, for which entomological studies are not sensitive enough (dry season, malaria according to altitude, urban exposure) or adequate (travelers, military corps).

One direct application of such a gSG6 peptide marker of exposure could lie in the elaboration of maps representing the risk of exposure to *Anopheles* bites. The development of such immuno-

epidemiological markers might represent a quantitative tool applied to field conditions and a complementary tool to those currently available, such as entomological, ecological and environmental data [36]. It could represent a geographic indicator of the risks of malaria transmission and thus a useful tool for predicting malaria morbidity risk as previously described [5]. Furthermore, it may represent a powerful tool for evaluation of vector control strategies (impregnated bednet, intradomiciliary aspersions, etc.) and could here constitute a direct criterion for effectiveness and appropriate use (malaria control program).

In conclusion, we have developed an original approach coupling bioinformatic and immuno-epidemiological tools, which succeeded in identifying a candidate for developing a marker of exposure to *An. gambiae* bites. A similar methodology could be applied to the challenge inherent in control of other vector-borne diseases.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the population of the Niakhar area for their participation in this study and the team of the "Intermittent Preventive Treatment" project (IRD-UR77 and US009) for their support.

We thank the Genomining® team for bio-informatic advices.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FS AP SC BA FR. Performed the experiments: AP MR. Analyzed the data: AP FR. Contributed reagents/materials/analysis tools: CS BC AL BA MM. Wrote the paper: AP DB BA FR.

References

- WHO, Department RBM, UNICEF (2005) World Malaria Report. Geneva: World Health Organization. WHO/HIM/MAL/2005.1102.
- Smith T, Killean 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.
- Ribeiro JM (1995) Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4: 143–152.
- Billingsley PF, Baird J, Mitchell JA, Drakeley C (2006) Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunol* 28: 143–153.
- Remoue F, Cornélie S, Ngom A, Boulanger D, Simondon F (2005) Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases. In: Garraud O, ed (2005) Update in tropical immunology. Fort P.O. Trivandrum, Herala, India: Transworld research Network. pp 377–400.
- Lane RS, Moss RB, Hsu YP, Wei T, Mesirov 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.
- 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.
- 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.
- Poinçon A, Remoue F, Rossignol M, Cornélie S, Courtin D, et al. (2008) Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiological marker of exposure to *Glossina* bites. *Am J Trop Med Hyg* 78: 750–753.
- Remoue F, Alix E, Cornélie S, Sokhna C, Cissé B, et al. (2007) IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Trop* 104: 108–115.
- Remoue F, Cissé B, Ba F, Sokhna C, Herve J-P, 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.
- Waitayakul A, Somri S, Sattabongkot J, Loorcesuwan S, Cui L, et al. (2006) Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles* mosquitoes in Thailand. *Acta Trop* 98: 66–73.
- Ribeiro JM, Francischetti IM (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: salivome and post-salivome perspectives. *Annu Rev Entomol* 48: 73–88.
- Lombardo F, Lanfrancotti A, Mestres-Simon M, Rizzo C, Coluzzi M, et al. (2006) At the interface between parasite and host: the salivary glands of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parasitologia* 48: 573–580.
- Titus RG, Bishop JV, Mejia JS (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: 131–141.
- Champagne DE (2005) Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. *Pathophysiol Haemost Thromb* 34: 221–227.
- Valenzuela JG (2002) High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1199–1209.
- Arca B, Lombardo F, Valenzuela JG, Francischetti IM, Marinotti O, et al. (2005) An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol* 208: 3971–3986.
- Calvo E, Andersen J, Francischetti IM, de L Capurro M, de Bianchi AG, et al. (2004) The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. *Insect Mol Biol* 13: 73–88.
- Orlandi-Pradines E, Almeras L, Denis de Senneville I, 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.
- Robert V, Dieng H, Lochouran I, Traore SF, Trape JF, et al. (1998) Malaria transmission in the rural zone of Niakhar, Senegal. *Trop Med Int Health* 3: 667–677.
- Cissé B, Sokhna C, Boulanger D, Millet J, Ba el H, et al. (2006) Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet* 367: 659–667.
- Lanfrancotti A, Lombardo F, Santolamazza F, Veneri M, Castrignano T, et al. (2002) Novel cDNAs encoding salivary proteins from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *FEBS Lett* 517: 67–71.
- Saha S, Raghava GPS (2004) BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. In: Berlin S, ed (2004) Artificial Immune Systems. Heidelberg. pp 197–204.
- Schönbach C, Koh JL, Flower DR, Wong L, Brusk V (2002) FIMM, a database of functional molecular immunology: update 2002. *Nucleic Acids Res* 30: 226–229.
- Singh H, Raghava GP (2001) ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 17: 1236–1237.
- Lawson D, Arensburg P, Atkinson P, Besansky NJ, Bruggner RV, et al. (2007) VectorBase: a home for invertebrate vectors of human pathogens. *Nucleic Acids Res* 35: D503–505.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–3402.
- Ribeiro JMC (2003) A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 865–882.
- Poinçon A, Cornélie S, Remoue F, Grebaut P, Courtin D, et al. (2007) Human/Vector relationships during Human African Trypanosomiasis: Initial

Développement d'un marqueur immuno-épidémiologique d'exposition spécifique à *Anopheles* spp.

Biomarker *An.gambiae* Exposure

- screening of immunogenic salivary proteins of *Glossina* species. Am J Trop Med Hyg 76: 327–333.
31. Cornélie 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. Calvo E, Dao A, Pham VM, Ribeiro JMC (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.
 35. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Chadaab R, et al. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. Science 298: 129–149.
 36. 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: 1361–1371.

Résumé des résultats

L'objectif principal de cette étude était d'identifier et de valider une protéine salivaire spécifique du genre *Anopheles* comme marqueur d'exposition spécifique aux piqûres d'*An. gambiae*. En nous basant sur les données bibliographiques, nous avons identifié la protéine gSG6 comme candidat optimal. Cette protéine appartient à la famille des protéines SG retrouvée exclusivement chez *Anopheles* et présente des propriétés immunogéniques chez des personnes exposées aux piqûres d'*Anopheles*. Afin de maximiser la spécificité à *Anopheles* et la reproductibilité du test immunologique, nous avons défini 5 peptides (gSG6-P1 – gSG6-P5) à partir de la séquence protéique de gSG6. La séquence de ces peptides a été définie à partir de la prédiction d'épitopes immunogéniques par des outils de bio-informatique. Nous avons par ailleurs vérifié l'absence de similarités de séquence entre les peptides et la séquence de protéines d'autres insectes vecteurs et d'organismes à partir des bases de données des génomes disponibles. Nous avons alors évalué l'immunogénicité de ces peptides. Une réponse IgG spécifique a été observée chez les enfants exposés à Niakhar, les 5 peptides ont montré des propriétés antigéniques. Cependant les peptides gSG6-P1 et gSG6-P2 présentaient la plus grande antigénicité. 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 gSG6-P1. Cette approche suggère que seule la réponse IgG spécifique de gSG6-P1 peut être un marqueur permettant l'évaluation spécifique de l'exposition aux piqûres d'*An. gambiae*.

2.3 - Acquisition des réponses immunes IgM et IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 au cours de la petite enfance

Les jeunes enfants de moins de 5 ans sont les premières victimes de la morbidité palustre. La disponibilité d'un marqueur immunologique évaluant l'exposition aux *Anopheles* dans le but d'améliorer la prise en charge du paludisme concernera en premier lieu cette classe d'âge. L'objectif principal de cette étude préliminaire était de comprendre la cinétique d'acquisition des Ac IgM et IgG spécifiques du peptide gSG6-P1, candidat marqueur principal, dans les premières années de vie d'enfants résidant en zone d'endémie palustre au Sénégal. La réponse IgM correspond à une réponse primaire donc induite par les premières expositions aux piqûres alors que la réponse IgG correspond à une réponse immune installée. Ainsi nous voulions vérifier si la réponse IgM ou IgG spécifique de gSG6-P1 pouvait être un marqueur d'exposition chez les très jeunes enfants, pour cela nous avons étudié l'acquisition simultanée de ces deux isotypes.

Matériel et méthodes

Population étudiée

Cette étude a été initiée en collaboration avec Jean-françois Trape (IRD-UR077). Elle concerne 10 enfants résidant dans le village de Ndiop situé au Sénégal. Ce village fait l'objet d'un suivi depuis 1993 dont l'Institut Pasteur de Dakar, l'IRD et le Ministère de la Santé et de la Prévention du Sénégal coordonnent les activités (Projet Dielmo-Ndiop). Pour chaque enfant nous disposons de prélèvements sanguins recueillis au cours de leurs deux premières années de vie.

Dosage immunologique des IgM et des IgG spécifiques à gSG6-P1 par ELISA

Le protocole est présenté dans le "matériel et méthodes" de l'article publié dans PLoS ONE (Poinsignon *et al.* 2008). Les conditions expérimentales concernant le dosage des IgM sont similaires à celles utilisées pour le dosage des IgG.

Analyse statistique

Les données ont été analysées sous le logiciel SAS. Nous avons testé l'influence de l'âge sur les réponses IgM et IgG à l'aide des modèles linéaires mixtes (procédure PROC MIXED de

SAS) afin de tenir compte des mesures répétées par enfant. Pour cela, les valeurs des ΔDO obtenues ont été transformées en logarithme (ln). Nous avons défini 5 classes d'âge (2-6, 7-12, 13-18 et 19-25 mois). Les variables sexe (garçon/fille) et saison (janvier à juin et juillet à décembre) d'ajustement ont été prises en compte comme variables potentielles.

Résultats

Evolution des réponses IgG au cours de la période d'étude

Les réponses IgM et IgG spécifiques du peptide gSG6-P1 ont été évaluées pour chaque enfant, à plusieurs âges, au cours de leurs deux premières années de vie (de 2 mois à 25 mois). L'évolution des réponses IgG individuelles est représentée pour chaque enfant sur la figure 43. Une grande hétérogénéité dans les profils individuels d'évolution de cette réponse IgG spécifique a été observée entre individu en fonction du temps. Néanmoins, les niveaux IgG anti gSG6-P1 les plus forts semblent être observés majoritairement au cours des saisons d'exposition aux piqûres (de juillet à octobre).

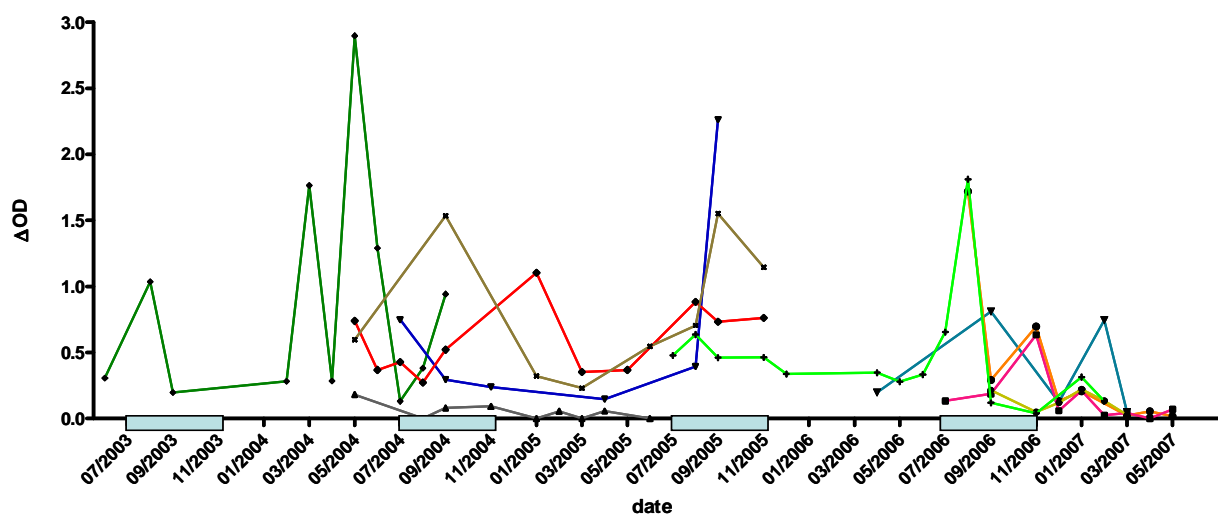


Figure 43. Evolution individuelle des réponses IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 pour les 10 enfants au cours de leurs deux premières années de vie. Les saisons d'exposition à *An. gambiae s.l.* sont indiquées par des rectangles bleus sur l'axe des abscisses.

Evolution des réponses IgM et IgG en fonction de l'âge des enfants

Afin de comprendre l'acquisition de la réponse humorale spécifique au peptide gSG6-P1, nous avons analysé les réponses IgM et IgG spécifiques du peptide gSG6-P1 en fonction des classes d'âges (0-6, 7-12, 13-18 et 19-25 mois) (Figure 44).

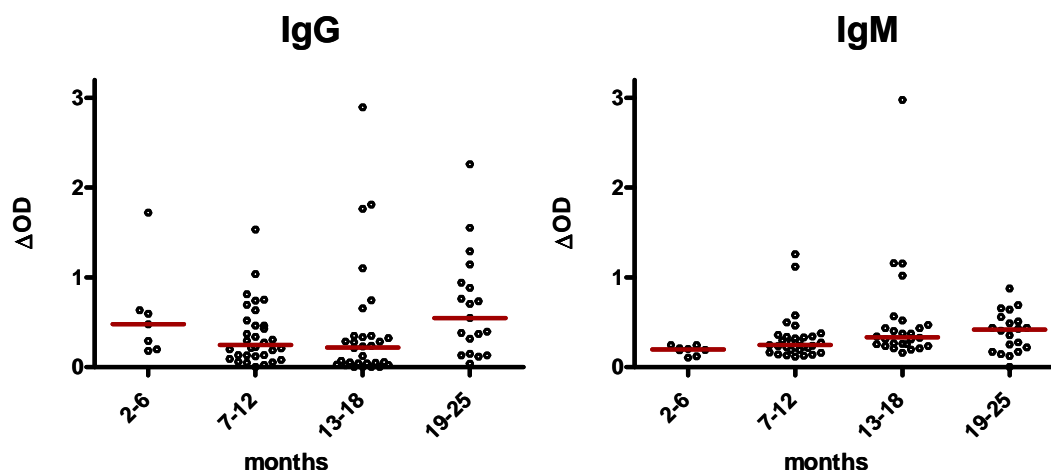


Figure 44. Evaluation des réponses IgM et IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 en fonction des classes d'âge des enfants. Les médianes sont indiquées par les barres. Suivant le nombre de prélèvements par enfant et leur distribution dans le temps, la réponse isotypique d'un même enfant peut apparaître plusieurs fois dans la même classe d'âge.

Les réponses IgM et IgG des enfants au cours de leurs deux premières années de vie présentaient des cinétiques de développement différentes. De leur naissance à leur six premiers mois, tous les enfants présentaient une très faible réponse IgM. Cette réponse IgM spécifique augmentait progressivement jusqu'à leur 2 ans d'âge. A l'inverse, la cinétique d'acquisition des IgG anti gSG6-P1 présentait un profil en "U". En effet, une réponse IgG a été détectée chez les enfants <6 mois. La médiane diminuait à 7-12 mois, restait stable à 13-18 mois et une augmentation importante a été observée chez les plus âgés.

Nous avons alors évalué les différences de réponse IgM et IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 en fonction des classes d'âge et en ajustant sur l'effet de la saison. Une différence significative entre les classes d'âge a été observée uniquement pour la réponse IgM ($P < 0.0001$). L'effet de l'âge sur la réponse IgG est moins marqué, et n'atteint pas le seuil de significativité de 5% ($P = 0.06$).

Discussion

Cette étude préliminaire a été conduite dans le but d'évaluer l'acquisition de la réponse IgM et IgG chez le très jeune enfant au cours de ses premiers mois de vie. Le développement des réponses IgM et IgG ne semble pas présenter le même profil d'acquisition. En résumé, la réponse IgM semble s'acquérir progressivement avec l'âge alors que les IgG, déjà présents entre 2 et 6 mois n'augmentent fortement qu'à partir de 19-25 mois.

À la naissance, un enfant est dit naïf, son système immunitaire est peu développé. L'immunité humorale se met progressivement en place et on observe très peu de réponse anticorps de type secondaire "IgG". Le nouveau né peut produire des IgM suite à une primo-exposition mais il n'est pas capable de produire des IgG. 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 *et al.* 1966). Ces anticorps maternels constituent la forme primaire des défenses immunitaires de type humoral. Cette réponse humorale est temporaire, les anticorps maternels sont progressivement éliminés selon le métabolisme classique des Ig (demi-vie environ de 3 semaines), l'immunité maternelle dure environ 12 semaines. Les IgG peuvent également être transmis à l'enfant *via* l'allaitement.

Dans notre étude, le profil de la réponse IgM observé chez ces enfants semble caractéristique d'une acquisition progressive suite aux expositions répétées aux piqûres d'anophèles. A leur naissance, les enfants ne présentaient pas d'IgM anti gSG6-P1 et développaient progressivement des IgM spécifiques à ce peptide. Ainsi, dès l'âge de 7 mois un jeune enfant peut développer une réponse IgM spécifique à gSG6-P1, indiquant qu'un enfant de cet âge peut être exposé aux piqûres d'*Anopheles*.

Le profil de la réponse IgG laisse suggérer la présence d'IgG maternels chez les enfants de bas âge (2-6 mois). Un transfert d'IgG peut également avoir lieu au cours de l'allaitement de l'enfant par la mère pouvant expliquer un niveau élevé d'IgG jusqu'à 6 mois chez ces enfants. Le profil en "U" observé suggère que les IgG maternels pourraient disparaître progressivement et qu'une réponse humorale IgG se mettrait progressivement en place se traduisant par une augmentation de la réponse IgG à partir du 18^{ème} mois.

Il semblerait que des enfants naturellement exposés aux piqûres d'*An. gambiae s.l.* développent en premier lieu une réponse IgM spécifique au peptide gSG6-P1 suivie par une réponse IgG. Ceci correspond au schéma classique d'acquisition d'une réponse humorale à des antigènes.

Nous avons à notre disposition un faible échantillon composé uniquement de 10 enfants mais suivis régulièrement pendant leurs premiers mois de vie (un prélèvement par mois). Cette étude préliminaire constitue une première approche dans l'évaluation de l'acquisition des réponses IgM et IgG chez le jeune enfant. Nous avons néanmoins pu détecter une réponse IgM et IgG chez des très jeunes enfants. Cette étude représente une première approche sur la faisabilité d'utiliser ce type de marqueur d'exposition gSG6-P1 également chez les enfants de

très bas âge (< 2 ans). Afin de confirmer ces premiers résultats, il est prévu d'évaluer l'acquisition de la réponse IgM et IgG chez des enfants exposés naturellement aux piqûres d'*Anopheles* et ceci à plus grande échelle. Cette étude est intégrée dans un projet mené par l'IRD-UR010 (André Garcia et Agnès Le Port) à Tori-Bossito au Bénin intitulé "Survenue des premières infections palustres chez le nouveau-né : déterminants génétiques, biologiques et environnementaux". Une cohorte de 550 enfants est suivie de leur naissance à leur 12 mois de vie, un prélèvement sanguin de ces enfants sera disponible à 3, 6, 9 et 12 mois. Des échantillons du sang périphérique de la mère, du cordon ombilical et du placenta seront également disponibles ce qui nous permettra d'évaluer la transmission des anticorps maternels à l'enfant. L'ensemble de ces prélèvements sera disponible à partir de fin 2009.

Résumé des travaux

L'objectif de cette étude préliminaire était d'étudier l'acquisition de la réponse IgM et IgG spécifique à gSG6-P1 chez des enfants au cours de leurs deux premières années de vie. Les profils d'acquisition semblent différents en fonction du type de réponse. La réponse IgM semble s'acquérir progressivement avec l'âge à partir des 6 premiers mois de vie alors que la réponse IgG semble se développer plus tard (18^{ème} mois). Les très jeunes enfants présentent des anticorps IgG spécifiques à gSG6-P1 dès leur naissance, ces Ac pourraient avoir une origine maternelle.

Chapitre 3

Exemples d'application de marqueur d'exposition

Dans ce chapitre de manuscrit, nous aborderons successivement deux exemples d'utilisation possible de marqueur d'exposition à la piqure des insectes vecteurs illustrant l'apport d'un tel marqueur dans la prise en charge et la lutte contre le paludisme.

3.1 - gSG6-P1, un marqueur d'exposition dans des zones de faible densité anophélienne

Les résultats présentés dans ce chapitre feront l'objet de la rédaction d'un article scientifique qui sera soumis pour publication prochainement. Ce manuscrit est actuellement en correction interne auprès des co-auteurs.

Human IgG response specific to one salivary gSG6-Peptide as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low exposure to *Anopheles* bites.

Poinsignon A., Cornélie S., Boulanger D., Sow C., Sokhna C., Cissé B., Arcà B., Simondon F., Remoue F.

Introduction

Malaria is a complex vector-borne disease with widely epidemiological profiles depending on the distribution and the efficiency of mosquito vectors, the environmental conditions and the acquired protective immunity by the exposed population. The development of control strategies needs to be designed according to the transmission and exposure contexts and according to the *Anopheles* species behaviour characteristics.

Efficient control of malaria remains particularly difficult in the human populations weakly exposed to transmission/infection. WHO reported that 29% of the global population lives in areas where the level of malaria transmission is low (WHO 1996). This transmission context is mainly characterised by strict seasonality, highland or “malaria of altitude” (>1500m), arid (<1000mm rainfall/year) and urban areas. For example, urban malaria becomes currently a serious health problem in several African cities where demographical development and migrations from rural areas increase (Baudon *et al.* 1996). In addition, the substantial increase of human migrations to and from malaria endemic areas allows to define new population of travellers presenting high risks of malaria morbidity. Despite a low exposure to *Anopheles*

vectors, such populations could present high severe risk of malaria morbidity and mortality, mainly because of the very slow development of acquired protective immunity. Indeed, the strategies for malaria control need to be adapted to these new epidemiological contexts of low exposure/transmission but with high risks for population.

The evaluation of exposure to malaria risk is currently based on entomological (Entomological Inoculation Rate) and parasitological methods (*Plasmodium* density). In a context of low transmission, the diagnosis of malaria infection in human by parasitological methods presents substantial limitations and need large-scale field evaluation. The evaluation of exposure level to *Anopheles* bites risk is currently based on entomological methods (traps, household/indoor spraying, human-landing catches, etc.), but these entomological methods are particularly not adequate for evaluating a low human exposure to *Anopheles* bites in several contexts of malaria risks, such as the decreasing exposure with the altitude, the urban malaria or the punctual exposure in travellers. Within these contexts, the number of *Anopheles* collected by these classical methods appeared so low for estimating the real degree of exposure and then the potential risk of malaria transmission. Furthermore, such methods are mainly applicable at the population level and do not enable evaluation of the heterogeneity of individual exposure.

A simple, rapid and highly sensitive tool appeared therefore necessary for evaluating the low exposure to *Anopheles* bites and thus to risk of malaria in populations very weakly exposed to the transmission. One type of research hypothesizes that exposure to arthropod vector bites can be evaluated by analysis of the antibody (Ab) response to arthropod saliva in human exposed populations (Billingsley *et al.* 2006; Remoue *et al.* 2005). Indeed, *Plasmodium* parasites are injected together with saliva during a blood-feeding by an infected *Anopheles* female. Salivary proteins have a dual role to facilitate mosquito blood feeding; their pharmacological properties permit to counteract the human defences (inflammatory and hemostasis) and their immunological properties modulate the immune response of the human host. In addition, some salivary proteins are immunogenic and can initiate a specific Ab response and several studies have shown that the anti-saliva Ab response could be a potential marker of exposure to vector-borne diseases in individuals exposed to bites of arthropod vectors, such as ticks (Lane *et al.* 1999), phlebotomies (Barral *et al.* 2000), *Triatoma* (Nascimento *et al.* 2001), *Glossina* (Poinsignon *et al.* 2008) and also *Aedes* mosquitoes (Remoue *et al.* 2007). As far as *Anopheles* spp. and malaria transmission are concerned, early epidemiological studies have shown that individuals living in malaria endemic area, i.e. exposed to *Anopheles* bites, developed specific anti-saliva Ab response (Remoue *et al.* 2006;

Waitayakul *et al.* 2006). In Senegal, our group has indeed demonstrated that IgG response to whole saliva of *An. gambiae* represents a marker of exposure to *An. gambiae* bites. Recently, we have investigated the immunogenic properties of *An. gambiae* saliva composition and identified the SG6 salivary protein previously reported i) specific to the *Anopheles* genus and ii) antigenic in exposed individuals. By a step by step approach, coupling bio-informatic and immuno-epidemiologic assessments, only one peptide, the gSG6-P1, derived from the gSG6 salivary protein of *An. gambiae* was defined and validated as a potential candidate as immuno-epidemiological marker specific to *An. gambiae* exposure. Indeed, the specific IgG Ab response to gSG6-P1 in Senegalese children was reported positively associated with the exposure to *An. gambiae* bites evaluated by the classical entomological methods (Poinsignon *et al.* 2008). Particularly, this peptide appeared to satisfy several requirements that such an exposure marker should fulfil. First, it thus far appears to be specific to the *Anopheles* genus and therefore, no relevant cross-reactivity phenomena with epitopes from other proteins (main *Diptera* species or pathogens) would be expected. Second, because of its synthetic nature, it guarantees high reproducibility of the immunological assay. Third, it elicits a specific Ab response which correlates well with the level of exposure to *An. gambiae* bites.

The objective of the present study represents one of application of this potential marker towards an indicator to evaluate the low exposure to *An. gambiae* bites. For these purpose, the study was conducted in a Senegalese area where the malaria transmission is strictly seasonal, during the rainy season and, especially, in villages where the level of exposure to *An. gambiae* bites was low. We have thus evaluated the IgG Ab level to gSG6-P1 peptide in weakly exposed children i) between the peak and the end of exposure season to *An. gambiae* bites and ii) according to the intensity of exposure as estimated by the classical entomological methods.

Methods

Study population

The present study was conducted in Niakhar, a rural district of central Senegal (115 km east of Dakar). This area is characterized by a dry savannah with a rainy season from July to October (approximately 400 mm of rainfall recorded). This area is typical of the Sahel and Sub-Sahel regions of Africa, where the occurrence of malaria is unstable, with a season of *P. falciparum* transmission mainly from September to November (Robert *et al.* 1998).

Sera were available from a clinical trial on seasonal intermittent preventive treatment for prevention of malaria performed in 2002 in children aged 6 weeks to 60 months (Cisse *et al.*

2006). Pairs of sera from a subsample of these children were available at the peak (September) and at the end (December) of the season of exposure to *Anopheles*, as previously described (Remoue *et al.* 2006); 125 children were selected in both September and December 2002, from villages only with low exposure to *An. gambiae* bites (Poinsignon *et al.* 2008; Remoue *et al.* 2006).

Both the trial on anti-malaria treatment and the present study followed ethical principles according to the Edinburgh revision of the Helsinki Declaration, and were approved by the ethical committees of the Ministry of Health of Senegal (August 2002 and May 2003, respectively) and of the IRD (Institute of Research for the Development) (January 2004). The anti-malaria trial was approved by the ethical committee of the London School of Hygiene and Tropical Medicine in June 2002. Written informed consent was obtained from the study population.

Entomological data

Entomological data were collected each month between September and December 2002 in 8 villages in the Niakhar studied area. Indoor samplings by light traps (CDC miniature light trap) were used to estimate anopheline biting rates (aggressiveness). Light traps operated for 2 consecutive nights in each house. Entomological sampling was carried out in 2 houses per village each month.

Analysis of entomological data led to defining 3 groups of individuals classified by their exposure level (Low (L), Intermediary (I) and Medium (M) exposure levels) to *An. gambiae* bites in September as previously described (Remoue *et al.* 2006). The bite human rate per night (BHN) was calculated by dividing the number of mosquitoes caught by the total trap-night involved in the study. The Low exposure group is composed of individuals from the 6 villages presenting a similar level of *An. gambiae* exposure. In contrast, Intermediary and Medium groups were represented by only one village each.

Salivary peptide gSG6-P1

The gSG6-P1 peptide has been designed with bio-informatic tools in the objective to maximize its *Anopheles gambiae* specificity and its antigenicity as previously described (Poinsignon *et al.* 2008). The gSG6-P1 peptide was synthesized and purified (> 80 %) by Genosys (Sigma-Genosys, Cambridge, UK) with an added N-terminal biotin. All peptides were shipped lyophilized and they were resuspended in 0.22 µm filtered milliQ water and stored in aliquots at -80°C before being used.

Evaluation of human IgG Ab levels ELISA

ELISA was carried out using salivary biotinylated gSG6-P1 antigen and sera were tested for IgG antibodies. Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with gSG6-P1 (20 µg/mL) in carbonate/bicarbonate buffer. Individual sera (1:20) were incubated in PBS-Tween 1%. Anti-gSG6-P1 IgG detection was performed using an HRP goat anti-human IgG Ab (1:25000, Nordic Immunology, Tilburg, Netherlands). 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% H₂O₂. Absorbance/Optical Density (OD) was measured at 405 nm. In addition, the absence of significant Ab detection was verified in wells without antigen (OD_n). Individual results were expressed as ΔOD value calculated according to the formula $\Delta OD = OD_x - OD_n$, where OD_x represents the individual OD value in antigen wells.

Statistical analysis

All data were analyzed with GraphPad Prism 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 and the non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparison between more than two groups. The Wilcoxon matched pair test was used to compare paired sera between September and December. We have verified distribution of age groups were balanced between epidemiologic groups with the Chi square test. All differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Entomological data

Entomological data led us to classify individuals in 3 groups of exposure according to intensity of exposure to *An. gambiae* bites (BHN): Low (L), Intermediary (I) and Medium (M). The dynamic of the *Anopheles* aggressiveness according to exposure group and to month is presented in figure 45.

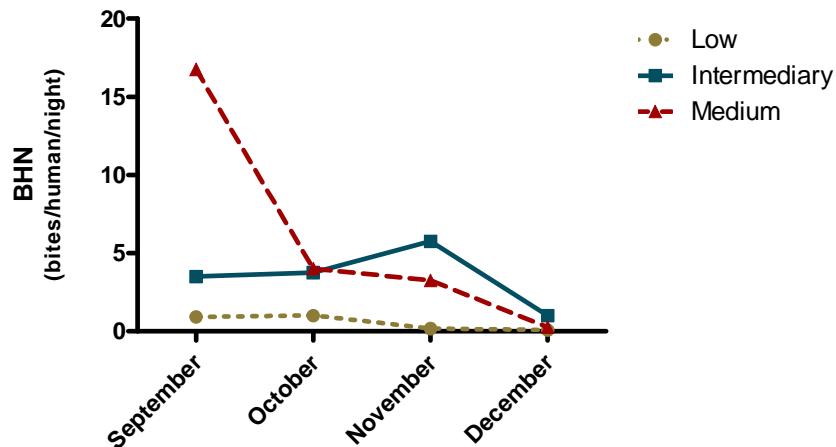


Figure 45. *An. gambiae* aggressiveness according to exposure group during season of exposure.

Mean ages of the individuals according to exposure groups were closely similar ($P=0.3641$): L: 22.41 (2-60); $n=61$ [mean (range) months; effective], I: 28.24 (2-60); $n=37$ and M: 22.41 (2-59); $n=27$.

The characteristics of the three exposure groups are presented in the table1.

Groupe of exposure	Low						Intermediary	Medium
Village	Dickorl	Kalom	Ngane	Ngayokem	Sass	Ngardian	Poutok	Logdir
Effective	3	14	16	5	6	4	37	27
Age (mean \pm SD) months	22 \pm 15,33	22,43 \pm 19,22	18,65 \pm 16,63	26,27 \pm 13,23	11,33 \pm 4,58	25,25 \pm 21,12	28,24 \pm 20,29	22,41 \pm 15,57

Table 1: characteristics of the study population according to exposure group

The 3 entomological groups were defined according to two criteria, as previously defined (Remoue *et al.* 2006): i) the intensity of BHN in September (the peak of the season of exposure to *An. Gambiae*) and ii) the continuous exposure from October to December.

The Low exposure group presented very low BHN in September and a very low aggressiveness rate (range from 0 to 2.5 BHN according to village) during the exposure season. In the Intermediary exposure group, *An. gambiae* were reported with a low rate from September to November (range from 3.5 to 5.75 BHN). In the Medium exposure group, a similar intensity of exposure compared to I group was observed in October and November (4 and 3.25 BHN respectively) but, only for this group, a peak of aggressiveness was observed in September (16.75 BHN). For all selected groups, no *An. gambiae* was collected in December.

Specific IgG response to gSG6-P1 salivary peptide

The IgG Ab level specific to gSG6-P1 peptide was evaluated according to the age of the children aged from 2 to 60 months at the peak (September) and at the end (December) of the season of *Anopheles* exposure (Figure 46).

The median value of anti-gSG6-P1 IgG level differed significantly according to age group both in September ($P=0.0071$) and in December ($P=0.0027$). In September, IgG response was higher in the youngest children group and declined progressively up to 60 months. Comparable medians of IgG level were observed in children from 13 to 48 months old. In December, a similar profile of IgG level according to age group was observed (data not shown).

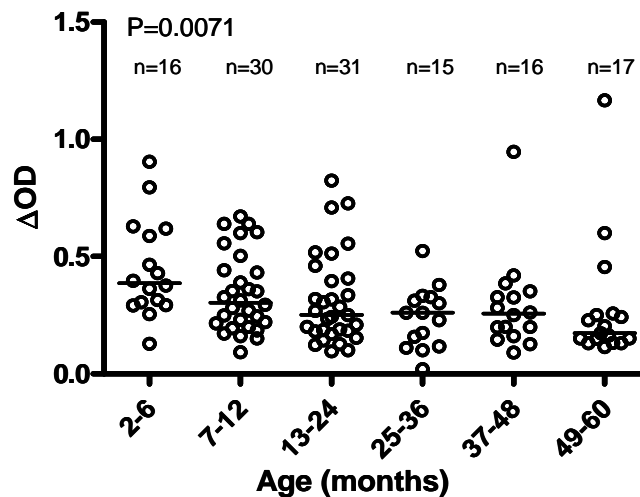


Figure 46. Evaluation of IgG Ab specific to *An. gambiae* gSG6-P1 according to the age of the children from a low endemic area. Individual absorbance (ΔOD) results obtained in September are shown for children aged 2 months to 60 months ($n=125$). Bars indicate the median value for each group.

We have previously verified that the distribution of age groups was balanced within gender group ($P=0.9020$) and within the occurrence of a clinical malaria group ($P=0.1541$).

In complementary analysis, specific IgG level was evaluated according to gender. The IgG median values were closely similar between male and female both in September and in December ($P=0.8750$ and $P=0.4781$ respectively, data not shown). In addition, the level of specific IgG to gSG6-P1 in September was related to the occurrence of clinical malaria (yes or no) during the studied period (from September to December), as previously evaluated for IgG to *An. gambiae* whole saliva extract (Remoue *et al.* 2006). In the present study, no significant difference was observed between IgG median values between these 2 malaria morbidity groups ($P=0.1668$, data not shown).

Evolution of specific IgG response to gSG6-P1 peptide during the season of exposure to *Anopheles* bites

The evolution of specific IgG Ab response to gSG6-P1 peptide was analyzed in the studied population between the peak (September) and the end (December) of the season of *Anopheles* exposure. For the whole studied population, the median of specific IgG level was significantly higher in December compared to September ($P < 0.0001$, Figure 47A) suggesting that anti-gSG6-P1 IgG response increased during the season of exposure.

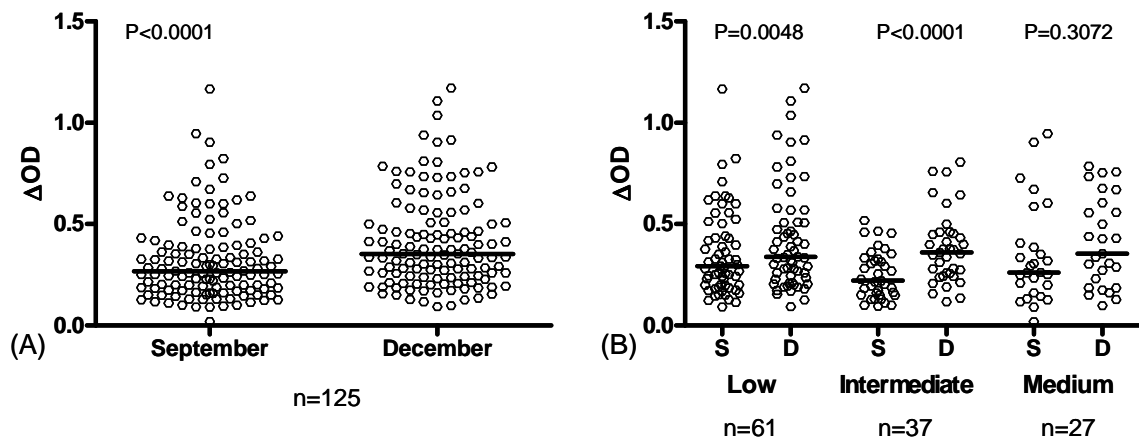


Figure 47. IgG antibodies to *An. gambiae* gSG6-P1 during the season of exposure in studied population (A) and according to the exposure group (B).

In addition, the evolution of specific IgG level between the peak and the end of the season of *Anopheles* exposure was compared according to the exposure groups, previously defined by entomological results (Figure 47B). The IgG median value was higher in December compared to September within the 3 exposure groups. However, this increase of specific IgG level during the season of exposure was only significant for the Low and Intermediate groups ($P = 0.0048$ for L group, $P < 0.0001$ for I group and $P = 0.3072$ for M group).

We have also verified that the distribution of age groups was balanced within the 3 exposure groups ($P = 0.2270$).

First analyses have been performed at the population level. As a preliminary approach toward a marker of exposure at the individual level, the evolution of specific IgG anti-gSG6-P1 was individually evaluated for each pair of sera during the season of *Anopheles* exposure. In the studied population, 69% of the children (86/125) presented an increase of their anti-gSG6-P1 IgG during the exposure season (December compared to September). According to the exposure group, specific IgG levels increased in 64% (39/61), 81% (30/37) and 63% (17/27) of children in the L, I and M group, respectively.

As one of applications of these results, the present objective was then to evaluate if the evolution of anti-gSG6-P1 IgG level could discriminate the individuals which were potentially exposed to *Anopheles* bites during the season of exposure. For this purpose, the individual evolution of specific IgG responses between September and December are presented in each group, only for children who have presented an increasing of IgG level (Figure 48).

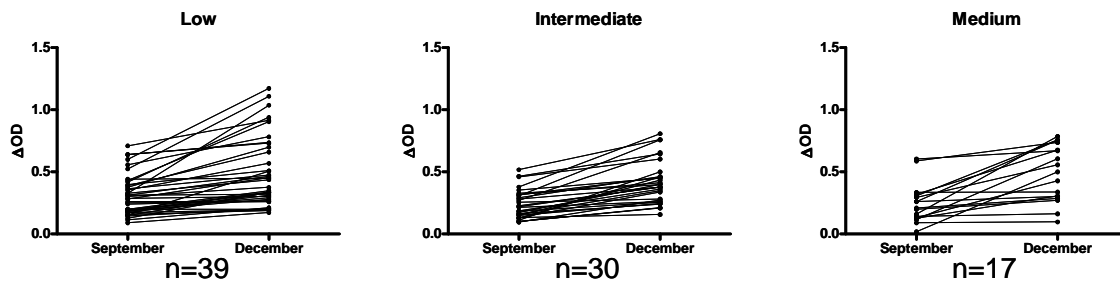


Figure 48. Individual increase of IgG antibodies to *An. gambiae* gSG6-P1 during the season of exposure.

Dissimilar positive evolutions of IgG level were observed according to the individuals, this heterogeneous trend appeared independent of entomological groups of exposure. Indeed, some individuals presented a high increase of their anti-gSG6-P1 IgG response from September to December compared to other children presenting a low increase of the IgG Ab within the 3 groups of exposure. Interestingly, children belonging to the Low exposure group with a weak IgG level in September presented an increase of their IgG level between September and December. This trend suggests that the individual assessment of the evolution of specific IgG levels during the season of exposure could allow discriminating the individuals who were exposed to *An. gambiae* bites in very low exposure areas. This marker could also evaluate the possible individual spatial heterogeneity of exposure to *Anopheles* bites in low exposure area. In low exposure context, few *Anopheles* are present which could enhance the heterogeneity of the exposure risk. Furthermore, *An. gambiae* female are characterized by a fidelity to feeding site, i.e. the female return to the same house to feed which increases the clustering (McCall *et al.* 2001).

We have also compared the evolution of specific IgG according to age groups, to the gender and to the occurrence of a clinical malaria outcome within the 3 months and no significant difference was observed ($P=0.326$, $P=0.401$ and $P=0.060$ respectively).

Discussion

The present study investigated the IgG Ab response specific to the salivary peptide gSG6-P1 in children exposed to low densities of *An. gambiae*. The interesting opportunity of this study was to follow the specific IgG Ab levels, in the same children, from the peak (September) to the end (December) of the season of low *Anopheles* exposure. Indeed, the following of specific IgG response to gSG6-P1 peptide, previously demonstrated as a marker of exposure to *An. gambiae* bites (Poinsignon *et al.* 2008), could be an adequate indicator to evaluate the real exposure of children between these two times of the exposure season (peak and end of exposure). We have shown that anti-gSG6-P1 IgG response was observed in a large majority of the studied children in September and in December. At the population level, specific IgG level was significantly higher in December compared to September whereas classical entomological methods collected very few *Anopheles* number during this period. According to the 3 entomological groups, this increase during the season of exposure was only significant in the Low and Intermediate groups whereas the entomological methods indicated a very low exposure without variation during the season. Moreover, an increase of specific IgG Ab level was observed in 69% of children during the season of *Anopheles* exposure. Altogether, this study reinforced the potential of the specific IgG response to the gSG6-P1 peptide as an immuno-epidemiologic marker of exposure to *An. gambiae* bites, particularly in areas where *Anopheles* density is low or very low.

The evaluation of mosquito density in contact with the human population represents the first step to identify the potential risk of malaria transmission and is currently based on entomological sampling of adult mosquito populations (traps, household/indoor spraying, human-landing catches, etc...) (Service 1977). Most of such methods are subject to bias inherent to human and vector behaviours, location of catches, and are mainly applicable at the population level. A major limit of these classical entomological methods is therefore the inadequate evaluation i) of exposure in a low vector density context and ii) of the heterogeneity of individual exposure. The trapping methods performed only in adult volunteers can estimate the individual exposure and are known to be the most reliable method for monitoring anthropophilic species. Nevertheless, they may be limited due to ethical constraints and limitations in terms of extrapolation to the real exposure of bites in children (Smith *et al.* 2004). Moreover, these entomological methods are laborious to take place in the field especially at a large scale.

In this way, a new area of research related to human-vector immune relationship tends to develop since the last decade. In the context of vector-borne diseases including malaria, the measure of the human exposure to vector bites could be achieved through the investigation of Ab response specific to vector saliva. Previous epidemiological studies related to malaria vectors indicated that individuals living in malaria endemic areas developed an IgG Ab response specific to *Anopheles* whole saliva extracts which increased significantly with the level of *Anopheles* exposure (Remoue *et al.* 2006; Waitayakul *et al.* 2006). Recently, a salivary peptide, gSG6-P1, specific to *Anopheles* species was underlined as potential candidate for evaluating the specific exposure of human to *An. gambiae* bites (Poinsignon *et al.* 2008). The evaluation of *An. gambiae* exposure based on the antigenicity of the gSG6-P1 assumes *Anopheles* species specificity by counteracting possible cross-reactivity between common epitopes on immunological salivary proteins between arthropods. The development of such marker of exposure based on the Ab response of human could be particularly of a great interest in context of low transmission area where referent entomological studies present significant limits. Indeed, the very low number of collected mosquitoes in these specific areas can represent an inadequate or unreal measure of exposure by classical entomological methods, especially due to possible day-to-day variation of collected mosquitoes (Kulkarni *et al.* 2006) and the limits of entomological studies in the field (differences between volunteers for human-landing catches, variations according to used traps, ...). In contrast, regular in time (monthly for example), large and optimal entomological survey is needed to give evaluation of low exposure with considerable limits presented above.

In the present study, children living in a low *Anopheles* density area presented a significant IgG Ab response specific to the peptide gSG6-P1 at the peak of the exposure season but, interestingly, with an increase of the intensity of specific IgG response during the season of exposure. Unfortunately, a lack in the present study concerned the absence of the Ab evaluation at the start of the rainy season (June, July) which could allow evaluating the development of specific Ab response from the start to the end of the bites exposure season. Nevertheless, in regard to the results, the following of the individual Ab level to this marker candidate at two main points, the peak and the end of the season of exposure, appeared to be pertinent to detect a very low exposure to *Anopheles* bites.

In this low exposure context, we have observed that specific IgG response of children increased within the 3 entomological groups of exposure from the peak to the end of the season of *Anopheles* exposure whereas in parallel a decrease of *Anopheles* density were assessed by classical entomological sampling method. In these kind of *Anopheles* density

areas, with less than 1 bite/human/night from September to December (Low exposure group), children present also a significant increase of their anti-gSG6-P1 IgG level between the peak and the end of the exposure season. In addition, in Low and Intermediate exposure villages, the entomological data recorded very few or no *Anopheles* from October to December whereas specific IgG response were detected and were higher in December, compared to September. It could be explained by a high sensibility and specificity of the epitopes present in the gSG6-P1 peptide after low immunological boost by few repeated bites. Indeed, gSG6 protein was not a major immunogenic salivary protein as observed in immuno-blotting analyses in children exposed to medium/high level of *Anopheles* density (Cornelie *et al.* 2007) whereas IgG specifics to this protein were reported in travelers shortly exposed to *Anopheles* bites (Orlandi-Pradines *et al.* 2007). Furthermore, in the same studied area and period, a previous study has investigated the specific IgG response to *An. gambiae* WSE (Remoue *et al.* 2006). Children living in Low exposure villages presented a significant decrease of their anti-WSE IgG level from September to December. In addition, previous results from our group have demonstrated that the IgG response to an other salivary protein (175 kDa) decreased during the season of exposure in the same area (Cornelie *et al.* 2007). The comparison between these results observed from the same children indicates that the Ab responses directed to whole saliva, to several salivary proteins or to specific peptide are not similar between them and according to the exposure intensity. It emphasizes the immuno-sensitivity of the gSG6-P1 peptide and its particular application as a marker of low or very low exposure to *An. gambiae* bites, in contrast to whole saliva or 175kDa salivary proteins. Particularly, the development of IgG response to this specific peptide could require repeated and low exposure to *Anopheles* bites to increase progressively in contrast to other proteins or whole saliva response which appeared just after individuals have received high intensity of bites to decline rapidly with the maintained exposure.

Furthermore, the gSG6-P1 peptide was defined on the *An. gambiae* gSG6 protein whereas the main vector in the studied area is *An. arabiensis*. This protein is not annotated in the Vectorbase database for *An. arabiensis* and therefore, the homology of sequences with *An. gambiae* is unknown but probably closely similar. Whereas gSG6-P1 appeared closely similar with other *Anopheles* species (81% of homology with *An. funestus* for example; (Poinsignon *et al.* 2008), we can not exclude that specific IgG Ab response detected in the present study, could be under-estimated, as previously discussed for whole saliva and gSG6 peptides (Poinsignon *et al.* 2008; Remoue *et al.* 2006). Altogether, the evaluation of IgG specific to gSG6-P1 seemed more sensitive and could be employed as a complement tool for evaluating *Anopheles*

exposure in areas where few or no *Anopheles* were recorded by classical entomological sampling methods.

Interestingly, it has been reported that specific IgG level was higher in the youngest children and decreased progressively up to the 60 month aged old. This population of very young children (<12 months) is probably very weakly exposed to *An. gambiae* bites because of the behaviour protection by the mother against mosquito nuisance (sleep under bednet with the mother for example). Nevertheless, we can not exclude that the youngest children are bitten by *Anopheles* but probably less than the olders. Our results showed that this specific population presented a specific anti-gSG6-P1 IgG response strengthening the high sensitivity of this peptide candidate as marker of very low exposure. However, the high specific IgG response observed in the youngest children could also result of the passive transfer of IgG from the mother to the foetus during pregnancy or breastfeeding. Indeed, it's known that the persistence of maternal Ab in offspring circulation is observed up to 9 months post-birth (Grindstaff *et al.* 2003) and at birth, fetal IgG typically somewhat exceeds maternal levels (Simister 2003). We can not conclude, in the present study, about the part of acquired specific IgG response induced by exposure to bites and those transferred by immune mother. This hypothesis is currently under investigation. Nevertheless, anti-gSG6-P1 IgG level appeared clearly age-dependent even if all studied age groups presented significant specific Ab response. The important point to validate such biomarker of exposure is here that specific IgG response to this peptide can be observed as well as in young than older children, the main population at risk of malaria.

In complement to the approach at the level of population, we investigated also the individual evolution of specific IgG response during the season of exposure and 69% of children living in Low, Intermediate or Medium exposure group presented an increase of their IgG Ab response between September and December. Altogether, these results indicated that the assessment of the evolution of anti-gSG6-P1 Ab level during the season of exposure could be used to evaluate the real exposure to *Anopheles* bites and, as a main point, at the individual level. This indicator, evaluated at just two time-points, could be therefore discriminating the individual which has been bitten during the season of exposure and this, in a low exposure area. This individual approach appeared here closely complementary to entomological methods which bring information of exposure at the level of an area or population, and with considerable limits when applied to low exposure situation.

The present study indicated that gSG6-P1 could be an interesting candidate as immunological biomarker of exposure in a context of low exposure to *An. gambiae* bites. The evaluation of

Ab response to this peptide could be then an alternative method to evaluate a low exposure to malaria vector, and this at the individual level. The use and application of such biomarker represent particular interests for the population lowly exposed to malaria transmission, such as urban, altitude or seasonal malaria and traveller population to endemic areas. In addition, this indicator of low exposure could be useful to survey the risks of new exposure to malaria vector after the use of anti-vector strategies (insecticide, bednet).

Résumé des travaux

L'objectif de cette étude était de valider le marqueur d'exposition gSG6-P1 chez des personnes faiblement exposées aux piqûres d'*An. gambiae*. Les personnes 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*. Par ailleurs, au niveau individuel, l'évaluation de l'évolution de cette réponse IgG entre le maximum et la fin de la saison d'exposition permettrait d'identifier les personnes les plus exposées.

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. Cet outil immuno-épidémiologique pourrait donc être un outil complémentaire permettant d'apprécier l'exposition des personnes dans des contextes de faible exposition.

Le peptide gSG6-P1 sera également validé en tant que marqueur d'exposition dans d'autres contextes de faible exposition aux anophèles.

Le premier projet de recherche s'inscrit dans une étude sur l'accès aux soins et le paludisme urbain qui a été financé par l'ANR (2007) et qui sera initié, sur le terrain, en Septembre 2008: « Paludisme et diversité de l'environnement urbain africain : un enjeu majeur pour la mise en place des thérapies à base d'artémisinine (ACT) » (Acronyme : Actu-Palu – Investigateurs principaux : R. Lalou (IRD-UMR 151) et JY Lehesran (IRD-UR10)). Le projet EpiVect est intégré spécifiquement au premier objectif du projet : « 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 spécifiques du peptide gSG6-P1 seront

comparées dans un premier temps aux données de détection et d'intensité de l'infection palustre chez ces mêmes individus et aux données épidémiologiques, environnementales et entomologiques disponibles (F. Pages, IMTSSA). Ceci permettra d'établir, entre autres, une cartographie de l'intensité d'exposition au vecteur *An. gambiae*, basée sur l'évaluation des réponses Ac anti-gSG6-P1 et de valider ce bio-marqueur de risque de transmission palustre par la comparaison avec les données parasitologiques, et ceci dans un contexte de faible exposition aux piqûres.

Le deuxième projet consiste à valider le peptide gSG6-P1 comme marqueur de faible exposition chez des individus faiblement exposés au risque de piqûre par les anophèles travaillant sur des plates formes pétrolières au large des côtes dans le Golfe de Guinée. Cette étude est effectuée en collaboration avec CGGVéritas.

3.2 - La réponse Ac spécifique de la salive d'*An. gambiae*, un critère d'efficacité dans l'évaluation de la LAV?

Exemple dans le cadre de la mise en place de moustiquaires imprégnées d'insecticides

Les moustiquaires de lit imprégnées d'insecticides sont considérées actuellement comme le meilleur outil de protection préventive contre la transmission du paludisme. Elles représentent un outil important dans le contrôle des populations d'*Anopheles*.

L'évaluation, actuelle et classiquement utilisée, de l'efficacité des moustiquaires est basée sur des méthodes entomologiques (évaluation des densités des populations de vecteurs et du taux de moustiques résistants aux insecticides) et parasitologiques (évaluation des densités parasitaires). Néanmoins ces méthodes de référence présentent des limites pour évaluer précisément chez l'homme l'efficacité de la mise en place et de l'utilisation de ces stratégies anti-vectorielles. Par exemple l'évaluation des densités à *Plasmodium* demande un suivi parasitologique précis au cours d'études longitudinales (suivi actif tous les 3 jours) et elle sous estime probablement l'intensité de la charge parasitaire réelle. La détection des plasmodiums peut varier selon les jours et un traitement anti-plasmodium est souvent donné sans confirmation parasitologique. De plus ces méthodes présentent des limites de sensibilité dans les zones de faible transmission où il est difficile d'évaluer les différences de parasitémie quand cette parasitémie est faible à l'origine. Afin d'améliorer les méthodes, et sous les

recommandations de l'OMS, de nouveaux outils doivent être développés pour évaluer avec précision et à un niveau individuel l'efficacité de l'utilisation des moustiquaires.

Cette étude constitue une première étape pour identifier un outil immunologique pouvant être considéré comme un outil complémentaire permettant l'évaluation de l'efficacité des stratégies anti-vecteur comme les moustiquaires. Pour cela nous avons comparé l'évolution de la réponse IgG spécifique aux antigènes salivaires d'*Anopheles* avec les critères de référence (parasitologique et entomologique) et ceci avant et après la mise en place de moustiquaires imprégnées chez des individus de la localité de Lobito en Angola de mars 2005 à octobre 2006. Cette étude entre dans le cadre d'une collaboration entre le Service médical de la Sonamet (compagnie spécialisée dans la fabrication d'équipements pour les installations de diverses compagnies pétrolières) et l'IRD-UR-016 (Dr. P. Carnevale).

Les résultats présentés feront l'objet de la rédaction d'un article scientifique qui sera soumis prochainement.

Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: a new immuno-epidemiological marker to evaluate the effectiveness of Insecticides Treated Nets (ITNs)?

Drame PM, **Poinsignon A**, Besnard P, Le Mire J, Cornелиe S, Foumane V, Sow C, Sembene M., Boulanger D, Fortes F, Carnevale P, Simondon F and Remoue F.

Matériel et méthodes

Population étudiée

Cette étude a été conduite à Lobito, une ville côtière de l'Angola (Figure 49), entre mars 2005 et octobre 2006. Lobito bénéficie d'un climat de type tropical humide caractérisé par une longue saison des pluies de novembre à mai et d'une saison sèche coupée de rares périodes orageuses de juin à octobre. La moyenne pluviométrique annuelle est de 600 à 700 mm et l'hygrométrie moyenne de 80 %. La transmission du paludisme est saisonnière pendant 7 à 12 mois avec un pic de transmission de janvier à avril correspondant à la saison des pluies. *Anopheles gambiae s.l.* constitue le principal vecteur du paludisme dans ce pays.

Cette étude longitudinale regroupe 21 familles (n=230 individus, population totale) résidant dans le même quartier de « Bella Vista » à Lobito. Ces familles ont reçu en février 2006 des

moustiquaires pré-imprégnées de deltaméthrine (moustiquaires Permanet®) dites «Long Lasting Insecticide Net» ou «LLIN». Nous avons sélectionné de manière non randomisée un sous échantillon de la population suivie (n=107, sous échantillon), incluant enfants (n=84, <15 ans) et adultes (n=23, ≥15 ans).



Figure 49. Situation géographique de l'Angola.
La ville de Lobito est indiquée par un cercle rouge.

Suivi parasitologique

Les individus ont été suivis médicalement toutes les 6 semaines de mars 2005 à octobre 2006. A chaque passage, un prélèvement sanguin sur papier buvard (dosage immunologique) ainsi qu'une goutte épaisse (GE) ont été réalisés pour chaque individu. Nous avons ainsi pu déterminer la prévalence parasitaire et les densités parasitaires (moyenne arithmétique et géométrique) pour la population totale et le sous échantillon sélectionné. La prévalence parasitaire est exprimée en pourcentage d'individus positifs et les densités parasitaires correspondent au nombre de parasites par μL de sang. La moyenne géométrique des densités parasitaires est calculée pour chaque passage en incluant tous les individus, aussi bien les positifs en GE que les négatifs. 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); c'est pourquoi l'échelle des valeurs de moyenne géométrique sur la figure commence à +1 et non à 0.

Une goutte de sang par prélèvement capillaire au bout du doigt a également été recueillie sur du papier Whatmann 3M pour les dosages des IgG anti-salive d'*An. gambiae*. Les buvards sont gardés au frigidaire à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Données entomologiques

Les anophèles ont été collectés chaque 6 semaines, de janvier 2005 à octobre 2006. Des pièges lumineux de type «CDC Miniature Light Trap» ont été installés de 19h à 7h à l'extérieur des maisons en vue de suivre l'évolution relative des densités de moustiques. Au total six maisons ont été choisies pour effectuer ces captures. Deux nuits de capture espacées de deux semaines étaient effectuées par passage.

Suivi de l'utilisation et de l'entretien des moustiquaires imprégnées Permanet®

Des enquêtes de suivi basées sur un questionnaire-réponse et des observations ont permis de suivre l'évolution de l'utilisation (présence/absence) et de l'état des moustiquaires (trouées...) en avril 2006 et en juin 2006.

Recueil des extraits salivaires totaux d'*Anopheles gambiae*

Les extraits salivaires totaux ont été collectés à partir de moustiques femelles *An. gambiae* s.s. non infectées élevées en l'insectarium (IRD-UR024 Dakar, figure 50).



Figure 50. Technique de salivation de moustiques (Remoue *et al.* 2006).

Les femelles sont endormies par du CO₂ et leurs pattes et ailes sont retirées du thorax sous loupe binoculaire. Le proboscis du moustique est alors introduit dans un cône plastique contenant 10 µl de tampon Hepes/NaCl/EDTA. Une application topique de 0,2µl de malathion à 0,25% dilué en acétone est alors effectuée. Ceci excite les moustiques et favorise la salivation. Après une heure de salivation, le liquide contenu dans le cône (salive + tampon) est collecté et regroupé avec les autres échantillons salivaires. Les extraits sont conservés au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Elution des buvards

Chaque goutte de sang présente sur le buvard est découpée et est éluee par 300 µl de tampon PBS-Tween 0.1%. Après 48h à 4°C, l'éluat est récupéré et conservé à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

Dosage immunologique des IgG anti-salive par ELISA

Un dosage des IgG spécifiques aux extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* a été réalisé à partir des éluas pour les individus du sous échantillon présents pour chaque passage.

Pour chaque individu, l'évaluation du taux d'IgG est réalisée en duplicate (DO_{Ag+}) et on vérifie l'absence de réponse non spécifique du sérum par un puits ne contenant pas d'antigène (DO_{Ag-}). Les résultats sont exprimés en ΔDO tel que $\Delta DO = [(DO_{Ag+1} + DO_{Ag+2}) / 2] - DO_{Ag-}$.

Analyses statistiques des résultats

Les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad-Prism 4 (San Diego, CA, USA). Après avoir vérifié que les valeurs ne suivaient pas une distribution gaussienne, le test non paramétrique de Mann-Whitney U-test a été utilisé pour comparer les taux d'Ac entre 2 groupes indépendants et le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer plus de deux groupes. Toute différence est considérée significative quand $P < 0.05$.

Résultats

Suivi des moustiquaires

En février 2006, un total de 130 moustiquaires a été distribué aux familles. Deux enquêtes de surveillance de l'utilisation et de l'état des moustiquaires ont été réalisées en avril 2006 (maximum de la saison d'exposition à *An. gambiae*) et en juin 2006 (début de la saison sèche). Deux mois après la distribution des moustiquaires (avril 2006), 77% des moustiquaires étaient installées parmi lesquelles 71.5% étaient en bon état (non trouées). En juin 2006, 63% des moustiquaires étaient installées parmi lesquelles 53% étaient en bon état. Ce comportement de faible installation des moustiquaires semble tout à fait explicable par la faible nuisance culicidienne dans la zone, surtout en saison sèche. Les populations n'utiliseraient les moustiquaires que lors d'une forte nuisance culicidienne et non pas par crainte du paludisme (Carnevale *et al.* 1988). Ceci relance le vrai débat sur les limites éthiques et sociales (acceptabilité des moustiquaires, déplacement des habitants, habitudes

culturelles, ...) et pose la nécessité d'une forte sensibilisation et surveillance lors des programmes nationaux et internationaux de lutte anti-vectorielle.

Suivis entomologique et parasitologique

Donnée entomologique

Les principales espèces anophéliennes capturées au cours des échantillonnages entomologiques sur les deux années de suivi appartiennent au complexe *An. gambiae*. Les variations des densités agressives d'*An. gambiae* s.l. exprimées par la moyenne d'*An. gambiae*/piège/nuit pour chaque passage du suivi sont représentées sur la figure 51.

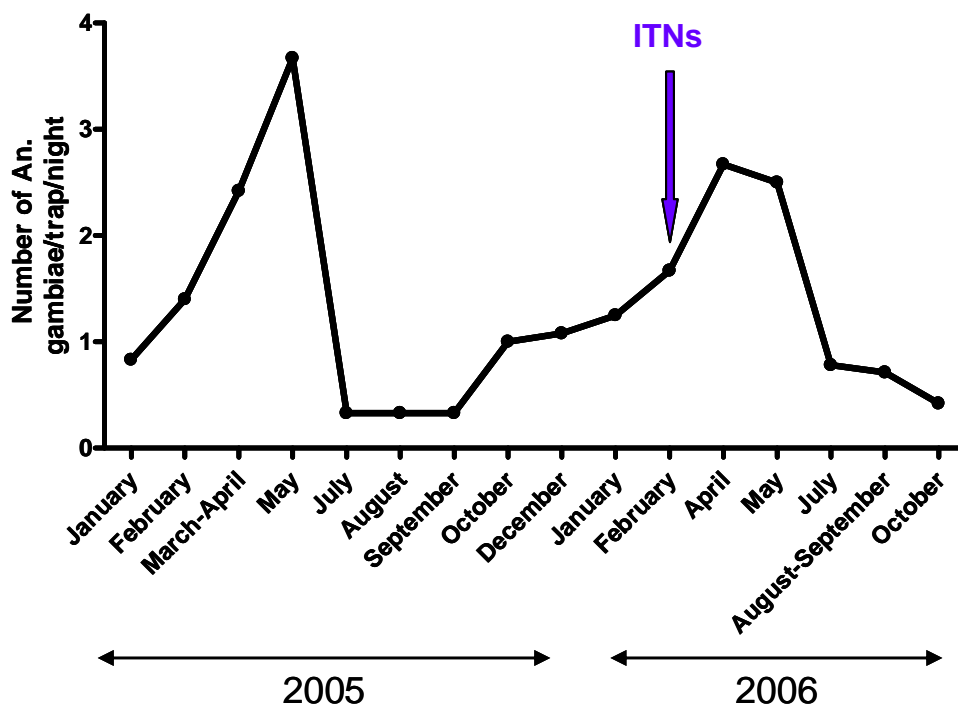


Figure 51. Variations mensuelles des densités agressives d'*An. gambiae*.

Malgré une faible agressivité d'*An. gambiae* s.l., les densités de population de ces vecteurs présentaient des variations d'intensité en fonction des saisons. Les anophèles ont été retrouvés en plus grand nombre au maximum de la saison des pluies, d'avril à mai et ceci est semblable en 2005 et 2006 malgré la mise en place des moustiquaires.

L'agressivité des anophèles diminuait fortement au cours de la saison sèche de juin à octobre. Après la mise en place des moustiquaires en février 2006, l'évolution des densités d'anophèles n'a pas semblé être modifiée par rapport à l'année précédente. En effet, une

augmentation des densités d'*Anopheles* a été observée jusqu'en mai 2006, néanmoins l'agressivité des *Anopheles* était très sensiblement plus faible que celle observée en mai 2005. Ces résultats suggèrent que l'utilisation des ITNs n'a pas induit de diminution significative de la population d'*An. gambiae* au niveau de la zone d'étude. D'après les captures entomologiques, l'exposition à ces moustiques peut être considérée similaire avant et après la mise en place des ITNs.

Dans le cadre de notre étude, les captures entomologiques ont été réalisées à l'extérieur des habitations. L'évaluation de l'effet létal des moustiquaires sur les populations d'*Anopheles* a de ce fait pu être biaisée en n'évaluant pas les densités de vecteur à l'intérieur même des maisons. De plus, nous sommes dans un contexte de faible exposition, les méthodes de capture entomologique peuvent présenter des limites de sensibilité et des faibles variations de densité peuvent ne pas avoir été détectées avec les techniques d'échantillonnage. Néanmoins, les travaux de J.C. Toto sur la composition intra-spécifique des formes moléculaires d'*An. gambiae* prélevées dans les habitations de cette étude ont montré la prédominance générale de la forme «S» (82%) par rapport à la forme «M» (18%) (communication personnelle). Le gène de la résistance aux pyréthrinoïdes (gène *kdr*) a été mis en évidence pour la première fois pour la forme «S» (Chandre *et al.* 1999). Nous ne pouvons donc pas exclure que certains *Anopheles* présents dans notre zone d'étude étaient résistants aux pyréthrinoïdes, cette hypothèse n'a pas été vérifiée par des tests moléculaires. Cependant des travaux antérieurs ont suggéré que ce phénomène de résistance, même s'il existait dans la zone, n'était pas trop important (Cuamba *et al.* 2006). De plus des études ont montré que la résistance des insectes aux pyréthrinoïdes n'entravait pas l'efficacité des moustiquaires, i.e. une réduction de la transmission du paludisme (Darriet 2007). Un taux de seulement 71.5% de bonne utilisation des moustiquaires en avril 2006 rapporté par les enquêtes de suivi de l'utilisation des moustiquaires pourrait expliquer le maintien des densités de population anophélienne dans la zone d'étude.

Prévalence et densité parasitaire

La prévalence parasitaire (% de GE positive) et la densité parasitaire ont été évaluées toutes les 6 semaines chez les individus. L'évolution de ces deux paramètres parasitaires chez la population totale et le sous échantillon à chaque passage est représentée sur la figure 52.

P. falciparum a été la seule espèce plasmodiale identifiée. Le pourcentage de GE positives correspond aussi bien à des cas de portage symptomatique qu'asymptomatique de *P. falciparum*. La prévalence parasitaire moyenne de la population totale et du sous échantillon

était faible et similaire (3.66% ou 3.86% respectivement) et présentait des variations en fonction des périodes de transmission/ exposition à *Anopheles*. Des variations saisonnières similaires ont été observées pour les densités parasitaires, exprimées en moyenne arithmétique et géométrique, chez les deux populations suggérant que le sous-échantillon sélectionné était représentatif de la population totale en terme de prévalence et des moyennes arithmétique/géométrique de l'infection palustre.

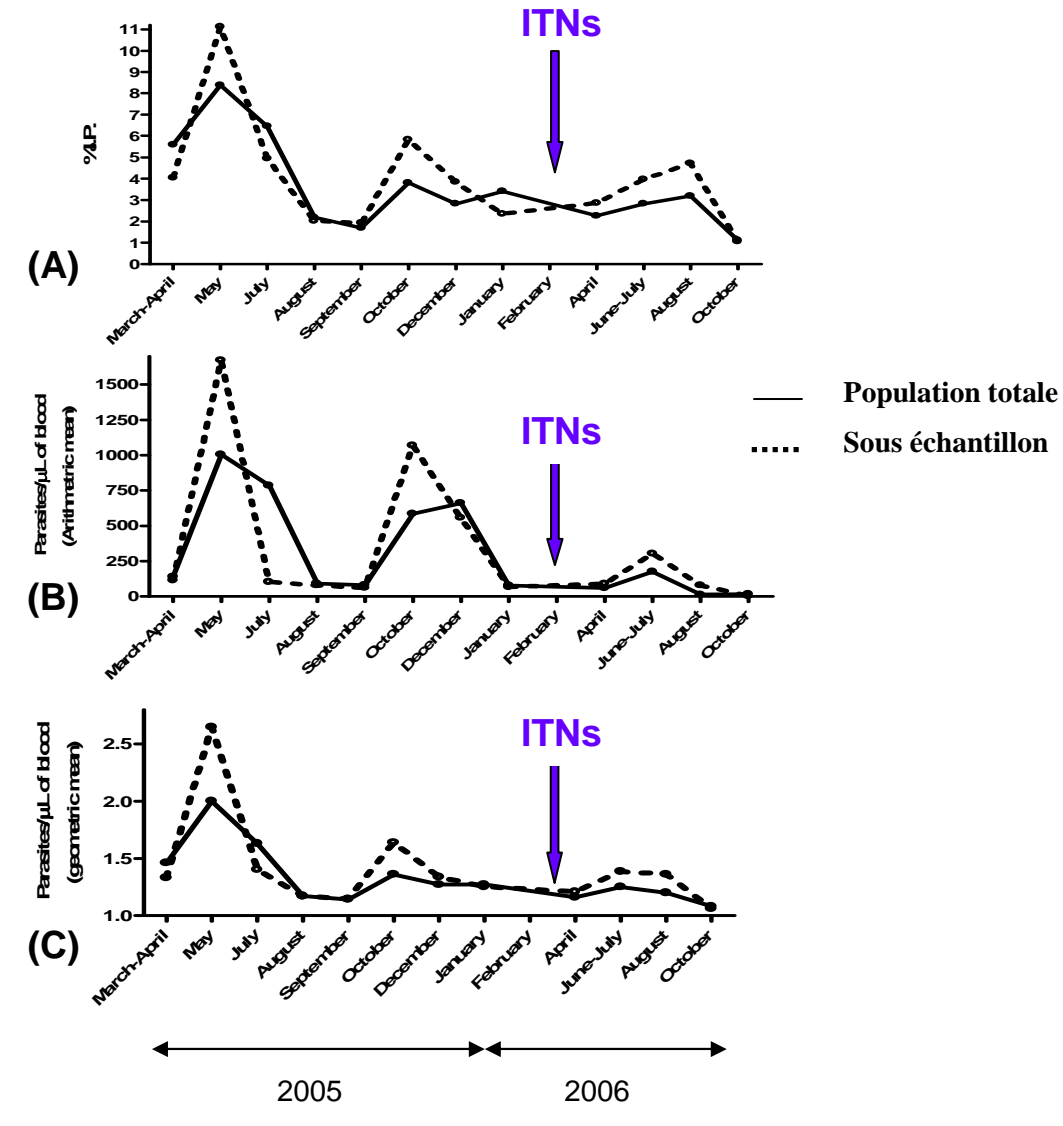


Figure 52. Évolution de la prévalence parasitaire (A) et des densités parasitaires (moyenne arithmétique (B) et géométrique (C)) chez la population totale et le sous-échantillon.

Des augmentations de la prévalence parasitaire et de la densité parasitaire ont été observées en mai 2005, correspondant à la fin de la saison d'exposition à *Anopheles* et en octobre 2005, mais d'intensité beaucoup plus faible. L'augmentation légère des paramètres parasitologiques

en octobre 2005 pourrait être liée à l'augmentation des populations anophéliennes observée à la même période.

Après la mise en place des moustiquaires à partir de février 2006, l'intensité d'infection et la prévalence parasitaire restèrent faibles jusqu'à la fin de la saison des pluies et une faible augmentation fut remarquée en juillet. Comparant mai 2005 (avant) et avril 2006 (après le mise en place des moustiquaires) une diminution de la prévalence parasitaire de 46% et de 40% a été observée pour la population totale et le sous-échantillon respectivement. Les suivis parasitologiques ont eu lieu toutes les 6 semaines et malheureusement les semaines calendaires ne correspondent pas entre 2005 et 2006, nous devons donc comparer les valeurs de mai 2005 avec avril 2006 ou juin/juillet 2006. Ces observations suggèrent que les moustiquaires ont permis une réduction de la transmission du paludisme se traduisant par un maintien à un taux faible de la prévalence et des parasitémies habituellement observées à la fin de la saison d'exposition à *Anopheles*, en juin. Par ailleurs, la prévalence du paludisme dans ce foyer est faible et une réduction de cet indice a néanmoins été observée. On observe donc un fort effet des moustiquaires sur l'intensité de transmission suggérant l'efficacité des moustiquaires dans les premiers mois d'utilisation (février à mai). Une baisse d'utilisation des moustiquaires (suite aux enquêtes de suivi) a été rapportée en avril 2006, parallèlement à une augmentation des populations anophéliennes ; ceci semble se traduire par une faible augmentation des indices parasitaires à partir d'avril jusqu'à juillet.

Evolution des réponses IgG anti-salive avant et après la mise en place de moustiquaires

La réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* a été évaluée pour chaque individu du sous-échantillon (n=107) toutes les 6 semaines d'avril 2005 à Octobre 2006. L'évolution des médianes de la réponse IgG spécifique à la salive est représentée sur la figure 53.

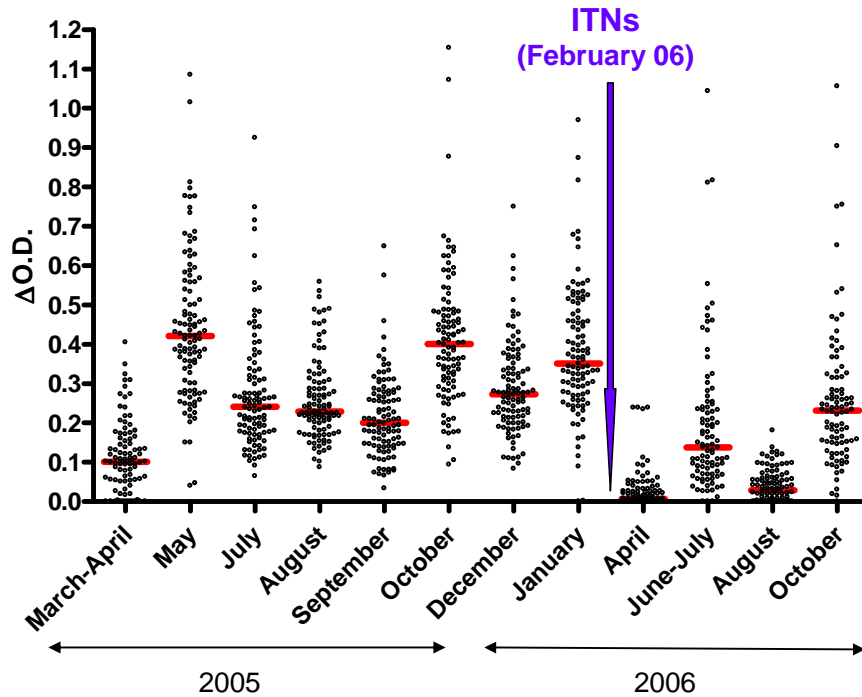


Figure 53. Évaluation des réponses IgG anti-salive d'*An. gambiae* chez les individus pour chaque passage. Les barres indiquent la valeur médiane pour chaque passage.

L'intensité des médianes de la réponse IgG spécifique à la salive d'*An. gambiae* entre mars 2005 et janvier 2006 (avant la mise en place des moustiquaires) chez les individus de Lobito présentait des variations saisonnières qui paraissaient synchronisées avec les variations des densités anophéliennes et des indices parasitologiques précédemment décrites. En effet l'intensité de cette réponse IgG est maximale en mai, diminue de juillet à septembre 2005 et présente un deuxième accroissement en octobre 2005. Ces observations indiquent que le niveau d'IgG spécifique aux protéines salivaires d'*An. gambiae* apparaît positivement associée au degré d'exposition des individus, comme précédemment suggéré par une étude au Sénégal chez des enfants de 0 à 5 ans, (Remoue *et al.* 2006). Par ailleurs, la réponse immune IgG apparaît également liée aux variations des densités parasitaires. La réponse IgG anti-salive pourrait représenter un marqueur d'exposition aux piqûres d'*Anopheles* mais également un marqueur de transmission comme il l'a été également décrit précédemment en Thaïlande. Une réponse humorale (IgG et IgM) contre les protéines des glandes salivaires d'*An. dirus* a été détectée chez l'homme et cette réponse IgG était plus élevée chez des individus infectés par *P. falciparum* en comparaison avec des individus non infectés vivant dans la même zone endémique (Waitayakul *et al.* 2006). L'augmentation du taux d'IgG anti-salive en octobre 2005 pourrait donc être associée à la faible augmentation mais progressive des densités d'*An.*

gambiae observée à partir de ce mois. Mais cette augmentation des densités de vecteur était relativement faible alors que le taux d'IgG anti-salive était égal à celui observé au maximum de la saison d'exposition, en mai 2005. Cela pourrait suggérer que le développement de la réponse IgG semble très sensible aux augmentations de densité d'*Anopheles*.

L'influence des piqûres d'autres vecteurs (*Aedes* ou *Culex*) sur la réponse IgG anti-salive d'*Anopheles* pourrait expliquer la persistance d'une réponse IgG anti-salive en saison sèche de juin à septembre observée dans le cadre de cette étude. En effet, du fait de la présence dans la salive de protéines communes à plusieurs arthropodes hématophages, une possible réaction croisée entre espèces ou genres différents d'insectes peut être envisagée. Cependant, des travaux ont montré que cette réaction immunologique croisée semblait très faible ou inexistante. La réponse IgG évaluée à partir des extraits totaux d'*An. gambiae* serait donc spécifique de l'exposition d'*Anopheles* (Orlandi-Pradines *et al.* 2007; Remoue *et al.* 2006). Cette persistance de la réponse IgG anti-salive en saison sèche pourrait être alors induite par l'existence, pendant cette période, de gîtes potentiels d'*An. gambiae*. En effet, les enquêtes entomologiques ont rapporté que le stockage de l'eau dans les citernes, pour remplacer le manque d'eau de robinet, était fréquent ce qui pouvait favoriser ainsi le développement pré-imaginal d'*An. gambiae* (Toto *et al.*, non publié.). Cette observation souligne les limites de sensibilité de détection des méthodes entomologiques de capture des adultes (pièges). En effet, la présence à un faible niveau d'*Anopheles* a été confirmée par la mise en évidence de gîtes larvaires alors que les techniques entomologiques de piégeage ne collectent pas d'*Anopheles*. Par ailleurs, un maintien de la réponse IgG anti-salive durant cette saison sèche semble plus sensible pour évaluer l'exposition aux *Anopheles* et confirme que cette réponse IgG pourrait être un marqueur d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae*. Ainsi, l'augmentation de la réponse IgG anti-salive observée en janvier 2006 peut être associée à l'augmentation de l'agressivité d'*An. gambiae* observée d'octobre à décembre 2005. Ces résultats suggèrent une association entre le niveau d'IgG anti salive et l'intensité d'exposition à *An. gambiae* et de l'infection parasitaire avant la mise en place des moustiquaires.

Après la mise en place des moustiquaires en février 2006, la réponse IgG anti-salive des individus présentait un très faible niveau quantitatif en avril 2006 avec néanmoins une faible augmentation en juin/juillet puis en octobre 2006. De manière intéressante, l'augmentation des IgG anti-salive observée en mai 2005, période correspondant au maximum annuel de la saison d'exposition à *An. gambiae*, et suivie d'un maintien d'un taux élevé d'IgG en juillet et août n'a pas été retrouvée ou était très faible en 2006 alors que les densités des populations d'anophèles étaient peu diminuées d'après les captures entomologiques. En effet,

en avril la réponse IgG est très faible pour la grande majorité des individus ($0 < DO < 0.25$), suggérant un contact homme-vecteur quasi nul. La mise en place de moustiquaires semble donc réduire le contact homme-vecteur, cela se traduisant chez les individus par une diminution des indices parasitaires et par une chute de la réponse IgG spécifique aux protéines salivaires totales d'*An. gambiae*.

L'augmentation du niveau de réponse IgG remarquée en juin/juillet 2006 puis octobre 2006 pourrait être la conséquence du faible niveau d'utilisation des moustiquaires reporté au cours des enquêtes de suivi. Le niveau de réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* semble donc lié au niveau d'utilisation des moustiquaires. En effet, une très faible réponse IgG anti-salive est observée deux mois (avril 2006) après la mise en place des moustiquaires et cette réponse IgG augmente quand le taux d'utilisation des moustiquaires diminue (juin 2006). Ces IgG semblent donc labiles, ils disparaîtraient en 3 mois après la mise en place de barrières mécaniques diminuant le contact homme-vecteur. Le développement de la réponse IgG anti-salive semble également sensible au degré d'exposition, ces IgG ré-augmentent lors de faible ré-exposition.

L'évolution de la réponse IgG anti-salive en fonction de la période étudiée a été analysée en fonction de l'âge des individus. Nous avons défini 3 groupes d'âge : 0-6 ans ($n=49$), 7-14 ans ($n=33$) et >14 ans ($n=25$). L'évolution des IgG anti-salive entre 2005 et 2006 était semblable pour les trois groupes d'âge (résultats non présentés). Cela suggère que l'âge n'a pas d'influence sur le développement de la réponse Ac anti-salive dans la population étudiée. De plus, cela indique que la diminution du niveau d'IgG anti salive observée après la mise en place des moustiquaires est similaire entre les groupes d'âge (très jeunes enfants, enfants et adultes).

Pour la réalisation de cette étude, les échantillons sanguins des personnes suivies ont été recueillis sur du papier buvard à partir d'un prélèvement au bout du doigt. Ainsi, nous avons montré qu'il est possible de doser, par la méthode ELISA, des anticorps IgG anti-protéines salivaires d'*An. gambiae* à partir d'une collecte de petites gouttes de sang total sur du papier buvard. Ceci vient conforter des travaux qui ont montré une bonne concordance des résultats IgG anti-*P. falciparum* détectés, par ELISA et immunofluorescence indirecte entre des éluas de sang sur papier filtre et des sérums des mêmes individus (Wanderley *et al.* 1982). Ces résultats suggèrent que le sang total collecté et séché sur papier buvard est une alternative commode et fiable pour rassembler et transporter facilement des échantillons nombreux et

donc applicable aux études séro-épidémiologiques de grande échelle. De plus, cette technique d'échantillonnage est plus rapide, plus acceptable et demande moins d'expertise que la ponction veineuse (Rawat *et al.* 2001). Elle est aussi plus facile et plus sûre (Condorelli *et al.* 1994). Elle pourrait alors régler le problème particulier des prélèvements sanguins chez les petits enfants et nouveau-nés et simplifier les études immuno-épidémiologiques et vaccinales. Cette technique de prélèvement semble être particulièrement adaptée aux études de terrain sur le paludisme puisqu'elle permet en même temps la réalisation de goutte épaisse pour l'identification plasmodiale et de gouttes sur papier buvard pour le dosage d'Ac.

Résumé des travaux

Cette étude constitue une première étape dans la validation de l'utilisation d'un marqueur d'exposition pour l'évaluation de l'efficacité des stratégies utilisées dans la lutte anti-vectorielle.

Nous avons suivi la réponse IgG spécifique à la salive totale d'*An. gambiae* chez des individus avant et après la mise en place de moustiquaires imprégnées dans leur lieu d'habitation. Nous avons pu remarquer que dans les premiers mois qui ont suivi la mise en place de ces moustiquaires, période correspondant au maximum annuel de la saison d'exposition à *An. gambiae*, la réponse IgG anti salive totale d'*An. gambiae* présentait un très faible niveau chez les personnes suivies. La mise en place de moustiquaires semble donc réduire le contact homme-vecteur, cela se traduisant chez les individus par une diminution des indices parasitaires et par une chute de la réponse IgG spécifique aux protéines salivaires totales d'*An. gambiae*.

Une augmentation de cette réponse IgG spécifique à la salive totale d'*An. gambiae* a été observée quelques mois après la distribution des moustiquaires. Cela pourrait être la conséquence du faible niveau d'utilisation des moustiquaires reporté au cours des enquêtes de suivi. Le niveau de réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* semble donc lié au niveau d'utilisation des moustiquaires.

L'évaluation de la réponse IgG spécifique à la salive totale d'*An. gambiae* permettrait d'évaluer l'efficacité de stratégies anti-vectorielles à deux niveaux: 1- elle permettrait de comparer différentes stratégies anti-vectorielles entre elles; et 2- elle permettrait de suivre l'efficacité de ces stratégies dans le temps en suivant une éventuelle augmentation des IgG.

Une étude est actuellement en cours afin d'évaluer si le peptide gSG6-P1 pourrait être un marqueur immunologique évaluant l'efficacité des moustiquaires, comme présenté dans cette étude avec les extraits salivaires totaux d'*An. gambiae*.

Par ailleurs, ce peptide pourrait également être validé comme tel dans le cadre d'une étude menée à Tori-Bossito au Bénin. Il s'agit d'un essai randomisé au niveau communautaire où est comparée l'efficacité protectrice de différents outils de lutte antivectorielle antipaludique dans cette zone de forte résistance des *Anopheles* aux pyréthrinoides. Trois bras sont considérés: a) les villages témoins protégés selon les recommandations du PNLP (protection des enfants de moins de 5 ans par les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoides à longue durée d'action (MILD)), b) les villages totalement couverts par les MILD, c) les villages totalement couverts par les MILD associées aux bâches murales imprégnées d'un insecticide non pyréthrinoides (équivalent à une imprégnation intra domiciliaire).

Troisième partie

Conclusions & Perspectives

Développement d'un marqueur d'exposition

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent au développement de bio-marqueurs immunologiques évaluant l'exposition de l'homme aux piqûres des insectes vecteurs, en approfondissant les connaissances sur l'immunogénicité des protéines salivaires de ces arthropodes hématophages. Les études développées dans cette thèse ont concerné deux vecteurs de parasites protozoaires, les moustiques femelles *Anopheles* responsables de la transmission de *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme et d'autre part les glossines responsables de la transmission de *Trypanosoma brucei gambiense*, agent de la trypanosomiase humaine africaine.

Actuellement, les méthodes de référence permettant d'apprécier le niveau et le risque d'exposition des populations aux piqûres des insectes vecteurs sont essentiellement des méthodes entomologiques, basées sur l'échantillonnage des populations adultes d'insectes. Le choix des méthodes entomologiques dépend des objectifs fixés et de l'écologie des insectes étudiés. Mais la plupart des méthodes présentent des biais (favorisant une population d'insecte suivant leur écologie) et des limites (sensibilité, évaluation impossible à grande échelle, coûts importants, moyens lourds pour leur mise en place). Par ailleurs, les méthodes entomologiques classiques par piégeage renseignent sur l'exposition moyenne des populations au sein d'un même foyer mais ne permettent pas de mesurer l'hétérogénéité d'exposition entre individus. Il est particulièrement difficile d'estimer les densités de vecteurs réelles par rapport à l'échantillon obtenu. De plus, l'évaluation de la densité des populations adultes, donc du risque d'exposition aux piqûres, est la première démarche afin de définir le niveau de risque de transmission (EIR). Mais ces méthodes entomologiques ne permettent pas d'évaluer si ces vecteurs piquent réellement l'homme. Ces différentes limites sont encore plus importantes dans un contexte de faible exposition au vecteur (sensibilité) et dans le cadre de l'évaluation des stratégies anti-vectorielles. Les captures sur homme permettent de mesurer l'exposition au niveau individuel et sont les plus adaptées pour mesurer l'agressivité des insectes anthropophiles mais, en plus de problèmes éthiques évidents et des biais inhérents au capteur (pouvoir attracteur), ces méthodes permettent difficilement d'extrapoler le risque d'exposition aux enfants (Port *et al.* 1980). Il serait donc nécessaire de développer de nouveaux outils complémentaires permettant d'évaluer le risque d'exposition des populations humaines et des individus aux piqûres des insectes vecteurs.

Pour répondre à cet enjeu dans le cadre du paludisme et de la THA, nous avons, par des études séro-épidémiologiques, étudié la relation immune homme-vecteur en exploitant les propriétés immunologiques de certaines protéines salivaires des anophèles et des glossines. Cette approche est complémentaire aux méthodes entomologiques actuelles qui permettent de connaître la nature, la composition (sexe, âge, état nutritionnel, état infectieux vis-à-vis du pathogène...), la distribution géographique, l'abondance, les variations saisonnières de l'habitat et les densités ainsi que l'écologie des vecteurs.

Depuis une dizaine d'années, l'élaboration de marqueurs immunologiques d'exposition aux piqûres des insectes vecteurs pour les populations humaines a été démontrée pour plusieurs insectes vecteurs (*Ixodes*, *Triatoma*, *Aedes*, *Anopheles*...) et ceci à partir de l'étude de l'immunogénicité de la salive (réponse Ac spécifique). Mais, dans l'objectif d'utiliser ces marqueurs d'exposition à grande échelle, l'évaluation de la réponse Ac à partir des extraits salivaires totaux des insectes ne peut être envisagée. En effet, que les antigènes salivaires soient obtenus par dissection des glandes salivaires ou par recueil de la salive par des techniques de salivation, ces méthodes restent longues et fastidieuses. Par ailleurs, la composition en protéines salivaires peut être modifiée en fonction de différents paramètres intrinsèques au vecteur (âge, sexe, infection du vecteur, résistance aux insecticides,...) ceci pouvant influencer la reproductibilité des lots en terme de composition protéique. Mais surtout, certaines protéines salivaires d'arthropodes sont retrouvées de manière ubiquitaire au sein de la salive de plusieurs espèces d'insectes (l'apyrase par exemple). Ces protéines salivaires communes pourraient être source de réactions immunologiques croisées entre arthropodes. Pour pallier ces inconvénients et dans l'objectif d'élaborer des marqueurs d'exposition spécifique à un groupe d'espèces de vecteurs, il est nécessaire d'identifier une ou des protéines salivaires présentant les caractéristiques requises pour être un marqueur immunologique d'exposition (spécificité et immunogénicité). Ces candidats pourront être synthétisés biologiquement ou chimiquement optimisant ainsi la reproductibilité du test. Le choix du candidat peut être dirigé par les applications attendues de ce marqueur d'exposition. Par exemple, dans l'objectif d'élaborer un marqueur d'exposition spécifique d'un genre d'arthropode, l'identification de protéines salivaires uniquement retrouvées au sein de la salive des espèces de ce genre d'arthropode (voire de l'espèce) pourra répondre à cet objectif. Dans le cadre des deux vecteurs étudiés dans cette thèse, nous avons utilisé deux méthodes différentes afin d'identifier des candidats salivaires pour l'élaboration de tel bio-marqueur.

Lorsque ces travaux ont été entrepris, les connaissances sur la composition salivaire des glossines étaient limitées. Un nombre restreint de protéines salivaires avait été décrit et des propriétés immunogéniques avaient été mises en évidence pour la salive de *G. morsitans centralis* (Ellis *et al.* 1986). Mais les protéines impliquées n'avaient pu être identifiées.

Dans un premier temps, nous avons évalué si la réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux de glossine pouvait permettre de discriminer des personnes exposées ou non aux piqûres des glossines. Le niveau de la réponse IgG spécifique à la salive totale des individus vivant en zone d'endémie a été comparé à des individus témoins n'ayant jamais été en contact avec ces insectes. Les personnes vivant en zone de transmission de THA présentaient un très fort taux d'Ac IgG spécifiques de la salive de glossine, contrairement aux individus non exposés (européens). Les variations quantitatives de cette réponse IgG semblaient également apprécier l'hétérogénéité spatiale d'exposition à la piqûre des glossines. L'ensemble de ces travaux semblait indiquer que l'évaluation du taux d'IgG spécifiques à la salive des glossines permet non seulement de distinguer les personnes exposées ou non à la piqûre de ces insectes (exposées/non exposées) mais également de distinguer les niveaux de risque d'exposition entre villages (quantification d'un niveau d'exposition différent).

La disponibilité d'un tel outil épidémiologique serait particulièrement utile dans le cadre de la THA caractérisée par une transmission focale, et pourrait permettre l'identification des personnes présentant un fort risque de transmission des trypanosomes.

Nous avons déterminé les caractéristiques de ce test diagnostic d'exposition : sensibilité = 80%, spécificité = 100 % valeur prédictive positive = 100% et valeur prédictive négative = 73%, ce marqueur immunologique d'exposition présentait donc des caractéristiques épidémiologiques pertinentes.

Dans l'objectif d'identifier des protéines salivaires candidates pour l'élaboration d'un test d'exposition, nous avons détecté et comparé la composition en protéines salivaires antigéniques de quatre espèces de glossine (vectrices ou non) et ceci en fonction du statut des individus (exposés ou non, infectés ou non) par une approche d'immuno-empreinte. La composition des sialomes et des immuno-sialomes des glossines dépendait i) des espèces glossiniennes (vectrices ou non) et ii) du statut d'exposition (exposé ou non) et infectieux (infecté ou non) des individus. Au niveau individuel, les personnes exposées, infectées ou non, présentaient des profils immunogéniques hétérogènes. Néanmoins nous avons pu mettre en évidence trois protéines salivaires (37, 60 et 150 kDa) retrouvées chez la grande majorité des individus exposés qu'ils soient infectés ou non. Ces protéines pourraient représenter des

candidats pour l'élaboration d'un marqueur d'exposition. L'identification de ces protéines par spectrométrie de masse aurait pu permettre d'évaluer la spécificité de ces protéines aux glossines et d'identifier une protéine salivaire candidate pour l'élaboration de marqueur spécifique de l'exposition des glossines.

Nos travaux relatifs à la thématique des glossines se sont arrêtés suite à ces deux études. Néanmoins, ces premiers travaux ont permis de démontrer l'intérêt de l'évaluation de la réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux de glossines comme marqueur d'exposition et ont permis de détecter des protéines candidates. Une voie de recherche est maintenant ouverte vers le développement d'un tel bio-marqueur spécifique.

Cette thématique a été récemment reprise dans un projet appliqué à la trypanosomiose animale africaine développé au CIRDES de Bobo-Dioulasso dans le cadre de projet Aires-Sud « Etudes expérimentales de la réponse anti-salive de glossines chez les bovins d'Afrique de l'ouest : application à l'analyse de la trypanotolérance et à l'évaluation de l'exposition des troupeaux ». Cette étude vise à développer un marqueur séro-épidémiologique d'exposition et de risque à la trypanosomiose animale africaine pour les bovins et analysera les profils de réponse de ces bovins en fonction de leur trypanotolérance. Cette étude permettra de mieux comprendre les effets immunomodulateurs de la salive des glossines sur la réponse immune de l'hôte et l'établissement de l'infection par *Trypanosoma congolense*. Elle s'intéresse principalement à la mouche tsé-tsé de l'espèce *Glossina palpalis palpalis* en raison de son abondance relative en Afrique de l'ouest par rapport aux autres espèces et de son rôle de vecteur commun des trypanosomiose animale africaine et de la trypanosomiose humaine africaine.

En parallèle, nous avons donc orienté nos recherches sur le complexe *Anopheles/Plasmodium* correspondant à la thématique initiatrice du projet EpiVect et à ses activités majeures. En effet, le concept de l'évaluation de la réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* comme marqueur d'exposition avait préalablement été démontré au sein du laboratoire. Des enfants résidant dans une région impaludée au Sénégal développaient une réponse IgG spécifique à la salive totale d'*An. gambiae* dont l'intensité était associée positivement à leur degré d'exposition aux piqûres de ce vecteur, évaluée par des méthodes entomologiques classiques (Remoue *et al.* 2006). L'évaluation par ELISA du taux d'Ac spécifiques aux protéines salivaires d'*An. gambiae* pourrait donc être un moyen d'apprécier l'exposition aux piqûres de ce vecteur et de ce fait au risque de transmission du paludisme. Par ailleurs, la réponse Ac anti-salive semble également être un marqueur

d'exposition aux piqûres d'*Anopheles* chez des militaires français en Côte d'Ivoire et ainsi un indicateur applicable aux voyageurs exposés à ces infections pendant une courte durée (Orlandi-Pradines *et al.* 2007).

Dans l'objectif d'identifier un marqueur optimal d'exposition discriminant d'une piqûre de l'anophèle (genre et/ou espèce-spécifique, absence de réactivité-croisée avec d'autres vecteurs) et reproductible pour une utilisation possible à grande échelle, nous avons exploré le sialotranscriptome de plusieurs espèces d'anophèles à partir de la bibliographie et des bases de données disponibles. Nous avons ainsi identifié la famille des SG protéines (SG1-SG8) rapportée spécifique à *Anopheles spp.*. Parmi cette famille de protéines, la protéine gSG6 a été détectée antigénique chez des individus faiblement exposés aux piqûres d'*Anopheles* (Orlandi-Pradines *et al.* 2007), ceci ayant été confirmé par notre équipe chez des enfants vivant en zone endémique (S. Cornélie, communication personnelle). Cette étude a été réalisée en collaboration avec B. Arcà (Université de Naples et Rome, Italie) qui nous a fourni les protéines salivaires recombinantes gSG6 et gSG7. Contrairement à gSG7, une réponse Ac IgG anti-gSG6 a été détectée chez des enfants vivant en zone de transmission saisonnière du paludisme (Niakhar, Sénégal). Afin de pallier des problèmes de reproductibilité inhérents aux antigènes salivaires produits par synthèse biologique (reproductibilité, rendement) et dans un souci de maximiser la spécificité à *Anopheles*, nous avons défini 5 peptides (synthétisés par voie chimique) à partir de la séquence aminée de la protéine gSG6 par une approche bio-informatique en prenant en compte i) les potentialités antigéniques (prédiction d'épitopes antigéniques) et ii) l'absence de similarité de séquence avec des protéines d'autres vecteurs majeurs (*Aedes*, Glossines, *Culex*, Phlébotomes) et d'organismes à partir des bases de données des génomes disponibles. Les cinq peptides ont montré des propriétés antigéniques mais deux d'entre eux, gSG6-P1 et gSG6-P2, présentaient la plus grande antigénicité. Nous avons alors comparé le niveau de réponse IgG des individus en fonction de leur niveau d'exposition (faible, moyen et fort), évalué par des méthodes entomologiques classiques. Une augmentation de la réponse IgG au cours de la saison d'exposition et une association positive entre la réponse IgG et le niveau d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae* ont été trouvées significatives uniquement pour gSG6-P1. Cette approche suggère que la réponse IgG spécifique de gSG6-P1 peut être un marqueur évaluant spécifiquement l'exposition aux piqûres d'*An. gambiae*. La comparaison des séquences de SG6-P1 entre les principales espèces vectrices des *Plasmodium* (*An. funestus* et *An. stephensi*) suggère que ce peptide pourrait également être un marqueur d'exposition à ces vecteurs. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons identifié un village où *An. funestus* est la principale espèce

anophélienne présente. Ce village est intégré dans une étude du programme Pal-Fleuve mené par notre groupe en collaboration avec l'ONG Espoir Pour La Santé, l'Université Cheikh Anta Diop et l'Institut Pasteur de Dakar, dans la région Nord du Sénégal. Le village de Gankette Balla est situé dans la partie sud du Lac de Guiers (263 km de Dakar). Le climat est de type soudano-sahalien caractérisé par une courte saison pluvieuse de juillet à septembre et une longue saison sèche (octobre à juin). Une forte abondance d'*An. funestus* et une absence d'*An. gambiae* ont été enregistrées dans ce village (Dia *et al.* 2008) où le paludisme sévit à l'état hypo-endémique (Faye *et al.* 1998). Un suivi longitudinal a été effectué chez des enfants de 1 à 9 ans (7 passages) entre juin 2004 et décembre 2006. Une étude est actuellement en cours afin d'évaluer si le peptide gSG6-P1 pourrait être marqueur d'exposition chez des individus résidant dans ce village exposé majoritairement à *An. funestus*.

Les différences de répartition et de restriction géographique des anophèles et des glossines et leurs conséquences sur l'exposition des populations confèrent des caractéristiques différentes aux marqueurs d'exposition. En effet, dans le cas du paludisme, une des difficultés majeures est de pouvoir comparer les réponses IgG des individus vivant en zone endémique à des individus témoins non exposés aux vecteurs. Les anophèles sont retrouvés de manière endémique à travers le monde entier, excepté dans certaines zones géographiques ou en altitude, et l'obtention de sérum de personnes non exposées aux piqûres d'*Anopheles* reste difficile. Dans le cadre de la THA, les glossines étant exclusivement africaines, il était plus facile de disposer de sérums de personnes n'ayant jamais été en contact avec ces vecteurs. Ainsi la réponse IgG spécifique à la salive totale permet en premier lieu de discriminer une personne exposée ou non à la piqûre des glossines alors que dans le cadre du paludisme, la réponse spécifique à la salive des *Anopheles* permet plus spécifiquement d'apprécier l'intensité d'exposition (faible, moyen et fort) aux piqûres de ces vecteurs. Par ailleurs, les individus témoins qui n'ont jamais voyagé en Afrique, présentaient néanmoins une faible réponse IgG aux antigènes salivaires de glossine. Des réactions immunologiques croisées entre des protéines salivaires d'insectes proches phylogénétiquement des glossines, tels que les tabanidés, ne sont donc pas à exclure et devront être évaluées pour les études futures. Dans le cadre des anophèles, l'approche bio-informatique nous a permis de minimiser de possibles réactions croisées en sélectionnant des séquences peptidiques présentant de très faibles similarités avec des protéines d'autres vecteurs ou organismes vivants.

Le peptide gSG6-P1 a donc été identifié comme un marqueur optimal permettant d'évaluer l'exposition spécifique des enfants aux piqûres d'*An. gambiae*. La réponse IgG spécifique à ce peptide était positivement associée au degré d'exposition aux piqûres des anophèles, évalué par des méthodes entomologiques classiques. Par ailleurs, la réponse IgG spécifique à gSG6-P1 présentait une augmentation au cours de la saison d'exposition chez des enfants résidant dans des villages où de très faibles densités anophéliennes (1 piqûre/homme/nuit) sont observées. Le peptide gSG6-P1 semble ainsi détecter les individus faiblement exposés dans des contextes où les méthodes entomologiques présentent des limites de sensibilité. La mesure du taux d'IgG spécifique à deux temps distincts au cours de la saison d'exposition permettrait de détecter des faibles expositions et semblerait même évaluer l'hétérogénéité d'exposition. Ce marqueur pourrait donc représenter un outil épidémiologique utile afin de mieux comprendre les dynamiques de transmission dans les situations de faible exposition anophélienne dont le "paludisme urbain" ou d'altitude. Dans ces contextes, les individus ont une probabilité plus faible de s'infecter mais le développement de l'immunité de prémunition est de ce fait plus longue à acquérir favorisant les formes graves du paludisme chez le jeune enfant ou l'adulte (Trape *et al.* 1993). Le taux annuel d'accroissement de la population urbaine de 6% favorise le développement du paludisme urbain dans des environnements sanitaires inégalement développés, cette forme de paludisme est un réel enjeu de santé publique qui ne peut que s'accroître (Baudon *et al.* 1996). Le développement d'un tel bio-marqueur de faible exposition semble ainsi une voie importante pour prévenir l'apparition d'une morbidité chez ces populations.

La grande sensibilité immunogénique de l'épitope de gSG6-P1, se caractérisant par le développement d'une réponse IgG spécifique chez l'homme après seulement quelques stimulations antigéniques (faible exposition), permet de détecter des réponses spécifiques chez des très jeunes enfants (< 2 ans). En effet, des réponses spécifiques IgM et IgG ont été détectées et présentent des variations saisonnières chez de très jeunes enfants résidant au Sénégal.

Les enfants sont les principales victimes de la mortalité palustre, la disponibilité d'un marqueur d'exposition à la piqûre d'*An. gambiae* leur serait particulièrement destinée. Nous avons donc évalué, dans une étude préliminaire, l'acquisition de la réponse IgM (reflet d'une réponse immune précoce ou primaire) et IgG (reflet d'une réponse immune mature) spécifique à gSG6-P1 au cours des deux premières années de vie chez dix enfants résidant dans une zone de transmission palustre saisonnière à Ndiop (Sénégal). Les cinétiques de développement des

réponses IgM et IgG ne présentaient pas les mêmes profils en fonction de l'âge des enfants. Dans ce contexte épidémiologique, l'acquisition de la réponse IgM semblait progressive avec l'âge alors que les IgG, déjà présents au cours des 6 premiers mois de vie, n'augmentaient qu'à partir de la période 19-25 mois. 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 de l'allaitement. Les enfants développeraient dès les premières expositions aux piqûres d'*Anopheles* une réponse IgM suivie d'une réponse IgG spécifique.

Cette étude constitue 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 bio-marqueur chez les très jeunes enfants. Afin de confirmer ces premiers résultats une étude longitudinale évaluera l'acquisition de ces réponses IgM et IgG chez un plus grand nombre d'enfants (n=550) à 3, 6, 9 et 12 mois d'âge. Cette étude est intégrée dans un projet mené depuis 2007 par l'IRD-UR010 à Tori-Bossito (Bénin) intitulé "Survenue des premières infections palustres chez le nouveau-né : déterminants génétiques, biologiques et environnementaux". Des échantillons du sang périphérique de la mère, du cordon ombilical et du placenta seront également disponibles, ce qui nous permettra d'évaluer la transmission des anticorps maternels à l'enfant.

L'évaluation quantitative de l'exposition de populations humaines aux risques de piqûres d'arthropodes vecteurs de pathogènes pourrait s'avérer un outil épidémiologique utile dans le cadre de la lutte et/ou de la prévention de la transmission de la THA et du paludisme. Il est intéressant de noter que le protocole développé pour le recueil des échantillons sanguins dans le cadre de l'étude à Lobito en Angola permet l'applicabilité sur le terrain dans des zones rurales reculées et à des études épidémiologiques de grande échelle. Comme nous l'avons montré, le dosage des Ac spécifiques aux antigènes salivaires peut se faire à partir de gouttes de sang prélevées au bout du doigt et recueillies sur du papier buvard. Cette méthode est moins invasive (meilleure hygiène) donc mieux acceptée par les populations et permet le prélèvement de sang chez les très jeunes enfants. Ce protocole s'intègre donc parfaitement dans des études de suivi de l'infection palustre qui requièrent des prélèvements de sang au bout du doigt pour la réalisation des gouttes épaisses. Par ailleurs, les buvards peuvent être conservés à +4°C jusqu'à l'élution. Ceci représente un avantage considérable pour une application sur le terrain évitant de conserver les échantillons sanguins à -20°C.

Par ailleurs, on peut concevoir, à terme, l'évaluation du taux d'Ac anti-candidat marqueur d'exposition par un prélèvement capillaire au bout du doigt et l'utilisation de simple bandelette auto-réactive sur laquelle serait fixé le candidat salivaire. Cette technique serait particulièrement applicable sur le terrain et adaptée aux très jeunes enfants.

L'ensemble des résultats sur les deux modèles étudiés dans le cadre de cette thèse (glossine et anophèle) peut être schématiquement représenté (Figure 54). Nous avons donc abordé plusieurs aspects du développement d'un biomarqueur d'exposition: identification, validation et applications.

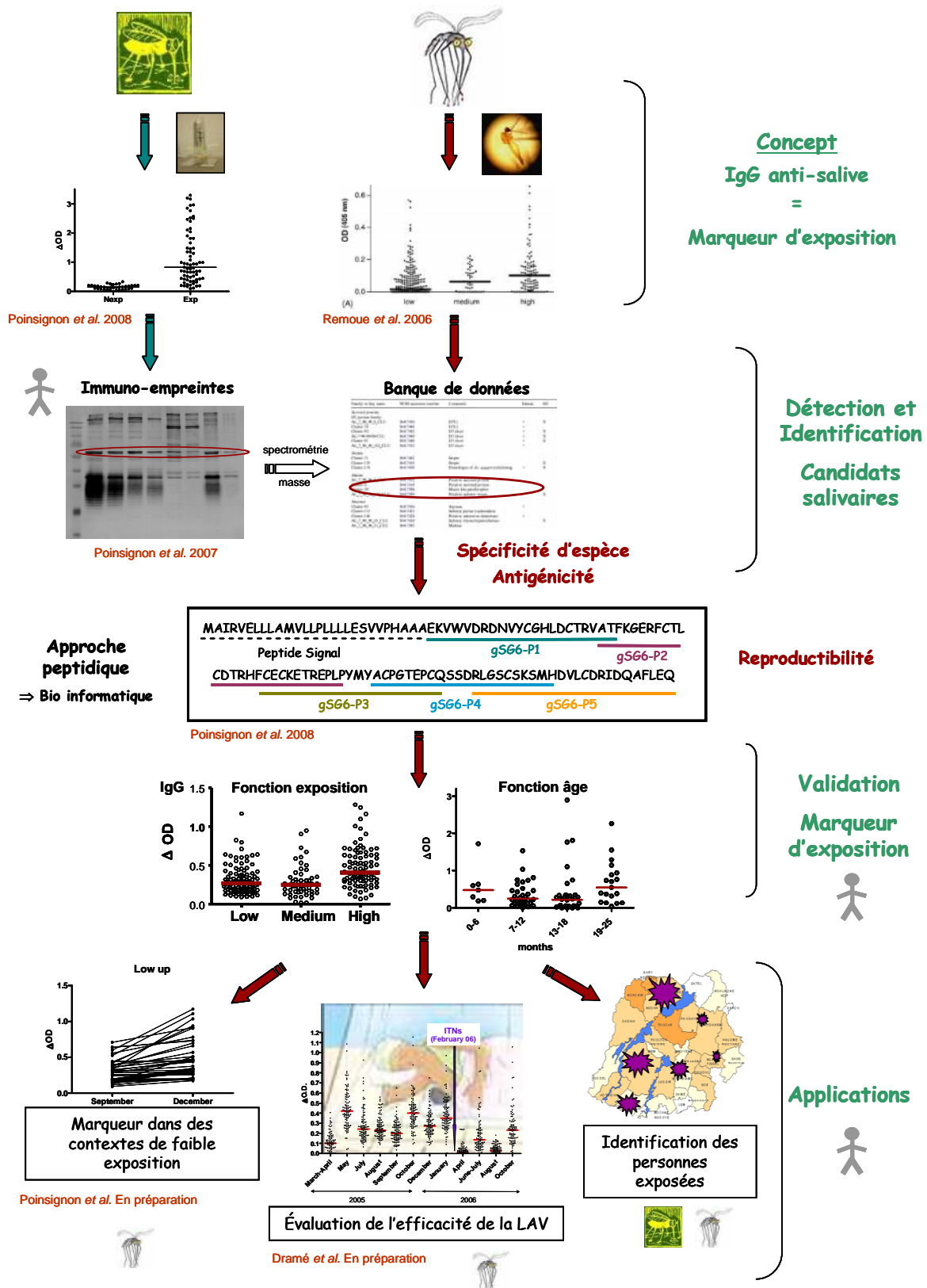


Figure 54. Schéma récapitulatif de la stratégie développée: de l'identification aux applications de marqueurs salivaires immunologiques d'exposition aux piqûres des glossines et des anophèles.

Les applications d'un marqueur d'exposition

La première application d'un tel marqueur immunologique pourrait être l'identification des personnes exposées aux piqûres des insectes vecteurs et donc au risque de transmission des pathogènes associés. Cette application revêt tout son intérêt dans le cadre de la prise en charge et de la lutte contre les trypanosomiasés africaines qui sévissent le plus souvent sous forme de foyer. Dans un contexte où la surveillance active des populations humaines permet d'identifier et de traiter les personnes infectées par des trypanosomes, l'identification des personnes vivant au contact des glossines permettrait d'orienter les équipes médicales dans des zones où le risque de transmission est le plus important. L'identification et la mise sous traitement des personnes en première phase de la maladie permet d'éviter les séquelles neurologiques irréversibles de la deuxième phase et permet également de diminuer la transmission au niveau d'un foyer. Comme nous l'avons remarqué dans notre étude, la réponse IgG anti-salive de glossine semble pouvoir apprécier l'hétérogénéité d'exposition entre des villages au sein d'une même zone. La disponibilité d'un tel marqueur serait particulièrement utile dans les pays où les services de santé sont limités et ne peuvent pas assurer la surveillance de toute la population comme c'est le cas dans la majorité des pays d'Afrique centrale où l'instabilité politique et les conflits désorganisent les systèmes de santé. Par ailleurs l'écologie caractéristique des glossines, permet, par des méthodes pluridisciplinaires associant la télédétection et la cartographie, de prédire par l'élaboration de SIG les gîtes de repos des glossines et ainsi les lieux de contact homme-glossine. L'intégration des données immunologiques évaluant l'exposition pourrait permettre de délimiter les zones de contact homme-glossine et ainsi d'orienter les stratégies de lutte anti-vecteurs adéquates et la mise à disposition des traitements en fonction des foyers à risque ainsi identifiés.

Dans le cadre de la lutte contre le paludisme, un marqueur identifiant les enfants les plus à risque de transmission des plasmodiums permettrait également de favoriser ainsi la disponibilité géographique des traitements aux populations les plus exposées aux risques. En effet les stratégies IPT pourraient être adressées préférentiellement aux enfants les plus exposés au risque de transmission du paludisme. Ceci permettrait, en évitant une couverture de masse, de réduire l'apparition de chimiorésistance dans le cadre de ces stratégies préventives. Par ailleurs, cet outil pourrait permettre d'orienter les campagnes de distribution de moustiquaires imprégnées aux foyers présentant des plus fortes densités anophéliennes.

L'usage de marqueurs d'exposition dans l'évaluation de l'efficacité des stratégies anti-vecteurs peut également être envisagée comme le souligne nos travaux. Ces stratégies entomologiques visent à réduire la transmission du paludisme en réduisant les populations de vecteurs. Les méthodes actuelles, chez l'homme, évaluant l'efficacité des méthodes de lutte anti-vectorielle, reposent sur la mesure des indices parasitaires (densité parasitaire) dans le cas du paludisme. Notamment dans des contextes de faible exposition, les paramètres parasitologique et entomologique peuvent être difficilement estimés compte tenu de la sensibilité des méthodologies actuelles. Dans notre étude, nous avons pu montrer que l'évaluation de la réponse IgG spécifique à la salive totale d'*An. gambiae* semblait être un indicateur de l'efficacité des moustiquaires imprégnées. Le peptide gSG6-P1 est actuellement évalué dans ce contexte afin de déterminer si il peut permettre l'évaluation de l'efficacité des stratégies développées dans la lutte anti-vectorielle. Un tel marqueur pourrait également comparer l'efficacité protectrice de différents outils de lutte anti-vectorielle ou comparer l'efficacité de nouveaux insecticides ou combinaisons d'insecticides.

Un tel marqueur aurait donc deux applications dans le domaine de la lutte anti-vectorielle. Il pourrait représenter 1) un outil permettant de comparer l'efficacité de plusieurs stratégies anti-vecteurs (=marqueur à court terme) et 2) un outil permettant de suivre l'efficacité des stratégies de LAV et de détecter les périodes où les stratégies ne sont plus efficaces et nécessitent une nouvelle sensibilisation des populations ou la mise en place d'une nouvelle stratégie (= marqueur à long terme).

Un tel outil serait donc plus adapté/complémentaire au niveau des essais d'efficacité de phase 3 où les indices parasitaires évalués chez l'homme demeurent les critères de référence. Les techniques parasitologiques peuvent présenter des limites en terme 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.

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 infections, le patrimoine génétique, etc, peuvent influencer le système immunitaire des personnes exposées. Néanmoins, comme indiqué dans nos travaux, la mesure de la réponse immune à deux temps au cours de la saison de transmission chez un même individu permettrait de détecter une faible exposition à un niveau individuel. Dans le cadre de l'exposition aux glossines, au regard des paramètres épidémiologiques du test, le marqueur

basé sur les extraits salivaires totaux semble discriminer individuellement les personnes exposées ou non à la piqûres des glossines.

Les travaux dans le cadre de cette thèse ont permis par des approches pluridisciplinaires d'identifier et de valider des marqueurs immunologiques (extraits salivaires totaux de glossines et gSG6-P1 d'*An. gambiae*) évaluant l'exposition des populations humaines aux piqûres des glossines ou des anophèles. Des études auxquelles le projet EpiVect est associé sont actuellement développées et permettront de valider i) le peptide gSG6-P1 dans différents contextes épidémiologiques (paludisme urbain, voyageurs, militaires, lutte anti-vectorielle) et ii) les extraits salivaires totaux de glossine puis des protéines immunogéniques spécifiques dans le cadre de la trypanosomiase animale africaine.

Par ailleurs, le développement de marqueur 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 marqueur prédictif de morbidité. L'expression de certaines protéines salivaires est altérée lorsque l'insecte est infesté par un pathogène et, par exemple, l'expression de la protéine gVAG est augmentée chez un anophèle infecté (Choumet *et al.* 2007). Elle pourrait représenter ainsi un candidat marqueur d'exposition à la piqûre infectante comme le projet EpiVect pourrait le démontrer dans le futur.

L'étude des protéines salivaires des insectes hématophages vecteurs apparaît comme une voie de recherche privilégiée. Les propriétés pharmacologiques de ces protéines salivaires pourraient permettre le développement de nouvelles molécules thérapeutiques anti-hémostase et anti-inflammatoire applicables en santé humaine (maladie cardio-vasculaire, maladie inflammatoire chronique...). L'étude des caractéristiques immunologiques de la piqûre des insectes vecteurs chez l'homme pourrait aboutir à une meilleure connaissance des mécanismes immunologiques intervenant dans les relations homme/vecteur et dans la transmission des pathogènes. L'identification et la caractérisation de ces protéines ont déjà permis de mettre au point des protocoles de désensibilisation dans le domaine de l'allergologie et suggèrent également de nouvelles stratégies vaccinales.

Les travaux de cette thèse contribuent à une meilleure connaissance des relations immunes homme-vecteur au cours de deux pathologies majeures que sont le paludisme et la

THA. Ce type d'approche peut être appliquée à d'autres maladies à transmission vectorielle émergente ou réémergente (arbovirose) tant dans les pays du Sud que du Nord. Le développement de ce type de bio-marqueur semble 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*.

Références Bibliographiques

- Abebe, M., Cupp, M. S., Champagne, D. and Cupp, E. W. (1995). Simulidin: a black fly (*Simulium vittatum*) salivary gland protein with anti-thrombin activity. *Journal of Insect Physiology* 41(11): 1001-1006.
- Akol, G. W. and Murray, M. (1982). Early events following challenge of cattle with tsetse infected with *Trypanosoma congolense*: development of the local skin reaction. *Vet Rec* 110(13): 295-302.
- Aksoy, S., Berriman, M., Hall, N., Hattori, M., Hide, W., *et al.* (2005). A case for a *Glossina* genome project. *Trends Parasitol* 21(3): 107-111.
- Al Serouri, A. W., Grantham-Mcgregor, S. M., Greenwood, B. and Costello, A. (2000). Impact of asymptomatic malaria parasitaemia on cognitive function and school achievement of schoolchildren in the Yemen Republic. *Parasitology* 121 (Pt 4): 337-45.
- Alger, N. E. and Cabrera, E. J. (1972). An increase in death rate of *Anopheles stephensi* fed on rabbits immunized with mosquito antigen. *J Econ Entomol* 65(1): 165-8.
- Almeida, A. P. and Billingsley, P. F. (1998). Induced immunity against the mosquito *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae): effects on mosquito survival and fecundity. *Int J Parasitol* 28(11): 1721-31.
- Alonso, P. L., Lindsay, S. W., Armstrong, J. R., Conteh, M., Hill, A. G., *et al.* (1991). The effect of insecticide-treated bed nets on mortality of Gambian children. *Lancet* 337(8756): 1499-502.
- Alonso, P. L., Sacarlal, J., Aponte, J. J., Leach, A., Macete, E., *et al.* (2005). Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet* 366(9502): 2012-8.
- Alonso, P. L., Sacarlal, J., Aponte, J. J., Leach, A., Macete, E., *et al.* (2004). Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet* 364(9443): 1411-20.
- Amino, R., Thiberge, S., Blazquez, S., Baldacci, P., Renaud, O., *et al.* (2007). Imaging malaria sporozoites in the dermis of the mammalian host. *Nat Protoc* 2(7): 1705-12.
- Amino, R., Thiberge, S., Shorte, S., Frischknecht, F. and Menard, R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *C R Biol* 329(11): 858-62.
- Anastopoulos, P., Thurn, M. J. and Broady, K. W. (1991). Anticoagulant in the tick *Ixodes holocyclus*. *Aust Vet J* 68(11): 366-7.
- Andersen, J. F., Ding, X. D., Balfour, C., Shokhireva, T. K., Champagne, D. E., *et al.* (2000). Kinetics and equilibria in ligand binding by nitrophorins 1-4: evidence for stabilization of a nitric oxide-ferriheme complex through a ligand-induced conformational trap. *Biochemistry* 39(33): 10118-31.
- Andrade, B. B., Teixeira, C. R., Barral, A. and Barral-Netto, M. (2005). Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad Bras Cienc* 77(4): 665-93.
- Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W., Das, S., Thomas, V., *et al.* (2002). Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits

- CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16(6): 849-59.
- Arakawa, T., Komesu, A., Otsuki, H., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R., *et al.* (2005). Nasal immunization with a malaria transmission-blocking vaccine candidate, Pfs25, induces complete protective immunity in mice against field isolates of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 73(11): 7375-80.
- 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(4): 1516-21.
- Arca, B., Lombardo, F., Francischetti, I. M., Pham, V. M., Mestres-Simon, M., *et al.* (2007). An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochem Mol Biol* 37(2): 107-27.
- Arca, B., Lombardo, F., Lanfrancotti, A., Spanos, L., Veneri, M., *et al.* (2002). A cluster of four D7-related genes is expressed in the salivary glands of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 11(1): 47-55.
- Arca, B., Lombardo, F., Valenzuela, J. G., Francischetti, I. M., Marinotti, O., *et al.* (2005). An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol* 208(Pt 20): 3971-86.
- Arevalo-Herrera, M., Solarte, Y., Yasnot, M. F., Castellanos, A., Rincon, A., *et al.* (2005). Induction of transmission-blocking immunity in Aotus monkeys by vaccination with a *Plasmodium vivax* clinical grade PVS25 recombinant protein. *Am J Trop Med Hyg* 73(5 Suppl): 32-7.
- Argentine, J. A. and James, A. A. (1995). Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 25(5): 621-30.
- Asidi, A. N., N'guessan, R., Koffi, A. A., Curtis, C. F., Hougard, J. M., *et al.* (2005). Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J* 4(1): 25.
- Balaban, N., Waithaka, H. K., Njogu, A. R. and Goldman, R. (1995). Intracellular antigens (microtubule-associated protein copurified with glycosomal enzymes)--possible vaccines against trypanosomiasis. *J Infect Dis* 172(3): 845-50.
- Barat, L. M., Barnett, B. J., Smolinski, M. S., Espey, D. K., Levy, C. E., *et al.* (1999). Evaluation of malaria surveillance using retrospective, laboratory-based active case detection in four southwestern states, 1995. *Am J Trop Med Hyg* 60(6): 910-4.
- 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(6): 740-5.
- Barreau, C., Touray, M., Pimenta, P. F., Miller, L. H. and Vernick, K. D. (1995). *Plasmodium gallinaceum*: sporozoite invasion of *Aedes aegypti* salivary glands is inhibited by anti-gland antibodies and by lectins. *Exp Parasitol* 81(3): 332-43.
- Barrett, M. P. and Fairlamb, A. H. (1999). The biochemical basis of arsenical-diamidine crossresistance in African trypanosomes. *Parasitol Today* 15(4): 136-40.
- Baudon, D., Gazin, P., Rea, D. and Carnevale, P. (1985). A study of

- malaria morbidity in a rural area of Burkina Faso (West Africa). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79(2): 283-4.
- Baudon, D., Louis, F. J. and Martet, G. (1996). In Africa, urban malaria is the malaria of tomorrow. *Med Trop (Mars)* 56(4): 323-5.
- Beck, L. R., Lobitz, B. M. and Wood, B. L. (2000). Remote sensing and human health: new sensors and new opportunities. *Emerg Infect Dis* 6(3): 217-27.
- Beck, L. R., Rodriguez, M. H., Dister, S. W., Rodriguez, A. D., Rejmankova, E., *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(3): 271-80.
- Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., *et al.* (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188(10): 1941-53.
- Bengaly, Z., Kasbari, M., Desquesnes, M. and Sidibe, I. (2001). Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. *Vet Parasitol* 96(2): 101-13.
- Billingsley, P. F., Baird, J., Mitchell, J. A. and Drakeley, C. (2006). Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunol* 28(4): 143-53.
- Bissonnette, E. Y., Rossignol, P. A. and Befus, A. D. (1993). Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells. *Parasite Immunol* 15(1): 27-33.
- Bogh, C., Clarke, S. E., Walraven, G. E. and Lindsay, S. W. (2002). Zooprophylaxis, artefact or reality? A paired-cohort study of the effect of passive zooprophylaxis on malaria in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96(6): 593-6.
- Boisson, B., Jacques, J. C., Choumet, V., Martin, E., Xu, J., *et al.* (2006). Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Lett* 580(8): 1988-92.
- Bojang, K. A., Milligan, P. J., Pinder, M., Vigneron, L., Allouche, A., *et al.* (2001). Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet* 358(9297): 1927-34.
- Boneu, B. and Cazenave, J. P. (1997). Introduction à l'étude de l'hémostase et de la thrombose Ingelheim.
- Boreham, P. F. (1975). Some applications of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. *J Trop Med Hyg* 78(4): 83-91.
- Bouma, M. and Rowland, M. (1995). Failure of passive zooprophylaxis: cattle ownership in Pakistan is associated with a higher prevalence of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89(4): 351-3.
- Bowman, A. S., Dillwith, J. W. and Sauer, J. R. (1996). Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. *Parasitol Today* 12(10): 388-96.
- Breman, J. G. and Holloway, C. N. (2007). Malaria surveillance counts. *Am J Trop Med Hyg* 77(6 Suppl): 36-47.
- Brennan, J. D., Kent, M., Dhar, R., Fujioka, H. and 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(25): 13859-64.
- Brightwell, R., Dransfield, R. D. and Kyorku, C. (1991). Development of a low-cost tsetse trap and odour

- baits for *Glossina pallidipes* and *G. longipennis* in Kenya. *Med Vet Entomol* 5(2): 153-64.
- Brossard, M. and Girardin, P. (1979). Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* L: humoral factors influence feeding and egg laying. *Experientia* 35(10): 1395-7.
- Bruce-Chwatt, L. J. (1952). Malaria in African infants and children in Southern Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* 46(2): 173-200.
- Brummer-Korvenkontio, H., Palosuo, T., Francois, G. and Reunala, T. (1997). Characterization of *Aedes communis*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* mosquito saliva antigens by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol* 112(2): 169-74.
- Bruneel, H., Van Den Eeckhout, A., Molisho, D., Burke, J., Degroof, D., *et al.* (1994). Control of *Trypanosoma gambiense* trypanosomiasis. Evaluation of a strategy based on the treatment of serologically suspected cases with a single dose of diminazene. *Ann Soc Belg Med Trop* 74(3): 203-15.
- Brunelleschi, S., Vanni, L., Ledda, F., Giotti, A., Maggi, C. A., *et al.* (1990). Tachykinins activate guinea-pig alveolar macrophages: involvement of NK2 and NK1 receptors. *Br J Pharmacol* 100(3): 417-20.
- Brunhes, J., Cuisance, D., Geoffroy, B. and J.-P., H. (2006). Les glossines ou mouches tsétsé.
- Burkot, T. R. and Graves, P. M. (1995). The value of vector-based estimates of malaria transmission. *Ann Trop Med Parasitol* 89(2): 125-34.
- Burkot, T. R., Williams, J. L. and Schneider, I. (1984). Identification of *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 33(5): 783-8.
- Buscher, P., Lejon, V., Magnus, E. and Van Meirvenne, N. (1999). Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. *Acta Trop* 73(1): 11-20.
- Caljon, G., Van Den Abbeele, J., Sternberg, J. M., Coosemans, M., De Baetselier, P., *et al.* (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(9): 1025-35.
- Calvo, E., Andersen, J., Francischetti, I. M., De, L. C. M., Debianchi, A. G., *et al.* (2004). The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. *Insect Mol Biol* 13(1): 73-88.
- Calvo, E., Dao, A., Pham, V. M. and Ribeiro, J. M. C. (2007). An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37(2): 164-175.
- Calvo, E., Debianchi, A. G., James, A. A. and Marinotti, O. (2002). The major acid soluble proteins of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands include a member of the D7-related family of proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 32(11): 1419-27.
- Calvo, E., Mans, B. J., Andersen, J. F. and Ribeiro, J. M. (2006). Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biol Chem* 281(4): 1935-42.
- Calvo, E., Pham, V. M., Lombardo, F., Arca, B. and Ribeiro, J. M. (2006). The sialotranscriptome of adult male *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 36(7): 570-5.

- Calvo, E. and Ribeiro, J. M. (2006). A novel secreted endonuclease from *Culex quinquefasciatus* salivary glands. *J Exp Biol* 209(Pt 14): 2651-9.
- Campbell, C. L., Vandyke, K. A., Letchworth, G. J., Drolet, B. S., Hanekamp, T., *et al.* (2005). Midgut and salivary gland transcriptomes of the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Insect Mol Biol* 14(2): 121-36.
- Campos, I. T., Tanaka-Azevedo, A. M. and Tanaka, A. S. (2004). Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *FEBS Lett* 577(3): 512-6.
- Cappello, M., Bergum, P. W., Vlasuk, G. P., Furmidge, B. A., Pritchard, D. I., *et al.* (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(5): 475-80.
- Cappello, M., Li, S., Chen, X., Li, C. B., Harrison, L., *et al.* (1998). Tsetse thrombin inhibitor: bloodmeal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(24): 14290-5.
- Carnevale, P., Frezil, J. L., Bosseno, M. F., Le Pont, F. and 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(1): 147-54.
- Carnevale, P., Robert, V., Boudin, C., Halna, J. M., Pazart, L., *et al.* (1988). Control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in Burkina Faso. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 81(5): 832-46.
- Carnevale, P., Robert, V., Snow, R., Curtis, C., Richard, A., *et al.* (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.
- Cdc (2005). Distribution of insecticide-treated bednets during an integrated nationwide immunization campaign---Togo, West Africa, December 2004: 54:994--6.
- Champagne, D. E. (2004). Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4(4): 375-96.
- Champagne, D. E., Nussenzveig, R. H. and Ribeiro, J. M. (1995). Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 270(15): 8691-5.
- Champagne, D. E. and Ribeiro, J. M. (1994). Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1): 138-42.
- Champagne, D. E., Smartt, C. T., Ribeiro, J. M. and 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(3): 694-8.
- Chandre, F., Darriet, F., Manguin, S., Brengues, C., Carnevale, P., *et al.* (1999). Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Cote d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc* 15(1): 53-9.
- Chimelli, L. and Scaravilli, F. (1997). Trypanosomiasis. *Brain Pathol* 7(1): 599-611.
- 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.
- Choumet, V., Carmi-Leroy, A., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J. C., *et al.* (2007). The salivary glands and saliva of *Anopheles gambiae* as an essential step in the *Plasmodium* life cycle: a global proteomic study. *Proteomics* 7(18): 3384-94.
- Cisse, B., Sokhna, C., Boulanger, D., Milet, J., Ba El, H., *et al.* (2006). Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet* 367(9511): 659-67.
- Clements, A., N. (1992). Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction. London.
- Coetzee, M., Craig, M. and Le Sueur, D. (2000). Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today* 16(2): 74-7.
- Coleman, M., Casimiro, S., Hemingway, J. and Sharp, B. (2008). Operational impact of DDT reintroduction for malaria control on *Anopheles arabiensis* in Mozambique. *J Med Entomol* 45(5): 885-90.
- Colman, R. W. and Schmaier, A. H. (1997). Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 90(10): 3819-43.
- Coluzzi, M., Calabro, M. L., Manno, D., Chieco-Bianchi, L., Schulz, T. F., *et al.* (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(4): 461-4.
- Coluzzi, M., Calabro, M. L., Manno, D., Chieco-Bianchi, L., Schulz, T. F., *et al.* (2004). Saliva and the transmission of human herpesvirus 8: potential role of promoter-arthropod bites. *J Infect Dis* 190(1): 199-200; author reply 200-1.
- Condorelli, F., Scalia, G., Stivala, A., Gallo, R., Marino, A., *et al.* (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(1): 25-36.
- Cook, S. P. and McCleskey, E. W. (2002). Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* 95(1-2): 41-7.
- Coosemans, M., Smits, A. and Roelants, P. (1998). Intraspecific isozyme polymorphism of *Anopheles gambiae* in relation to environment, behavior, and malaria transmission in southwestern Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg* 58(1): 70-4.
- Cornelie, S., Remoue, F., Doucoure, S., Ndiaye, T., Sauvage, F. X., *et al.* (2007). An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children. *Malar J* 6: 75.
- Cross, M. L., Cupp, E. W. and Enriquez, F. J. (1994). Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg* 51(5): 690-6.
- Cross, M. L., Cupp, M. S., Cupp, E. W., Galloway, A. L. and Enriquez, F. J. (1993). Modulation of murine immunological responses by salivary gland extract of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *J Med Entomol* 30(5): 928-35.
- Cuamba, N., Choi, K. S. and 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, E. W. and Cupp, M. S. (1997). Black fly (Diptera:Simuliidae) salivary secretions: importance in vector competence and disease. *J Med Entomol* 34(2): 87-94.
- Cupp, M. S., Ribeiro, J. M., Champagne, D. E. and 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(Pt 10): 1553-61.
- Dan, A., Pereira, M. H., Pesquero, J. L., Diotaiuti, L. and Beirao, P. S. (1999). Action of the saliva of *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *J Med Entomol* 36(6): 875-9.
- Darriet, F. (2007). Moustiquaires imprégnées et résistance des moustiques aux insecticides.
- Das, M. K., Mishra, A., Beuria, M. K. and Dash, A. P. (1991). Human natural antibodies to *Culex quinquefasciatus*: age-dependent occurrence. *J Am Mosq Control Assoc* 7(2): 319-21.
- Davie, E. W., Fujikawa, K. and Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30(43): 10363-10370.
- Deloron, P. and Chougnet, C. (1992). Is immunity to malaria really short-lived? *Parasitol Today* 8(11): 375-8.
- Dia, I., Konate, L., Samb, B., Sarr, J. B., Diop, A., *et al.* (2008). Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin. *Acta Trop* 105(2): 145-53.
- Diallo, P. B., Truc, P., Meda, H. A. and Kamenan, A. (1996). [Serologic diagnosis of human african trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei gambiense*. 1-Production and use of rough antigens in ELISA and latex agglutination tests]. *Bull Soc Pathol Exot* 89(4): 262-8.
- Diatta, M., Spiegel, A., Lochouarn, L. and Fontenille, D. (1998). Similar feeding preferences of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis* in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92(3): 270-2.
- Dickinson, R. G., O'hagan, J. E., Schotz, M., Binnington, K. C. and Hegarty, M. P. (1976). Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust J Exp Biol Med Sci* 54(5): 475-86.
- Dong, Y., Aguilar, R., Xi, Z., Warr, E., Mongin, E., *et al.* (2006). *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog* 2(6): e52.
- Donovan, M. J., Messmore, A. S., Scrafford, D. A., Sacks, D. L., Kamhawi, S., *et al.* (2007). Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *Infect Immun* 75(5): 2523-30.
- Dukes, P., Gibson, W. C., Gashumba, J. K., Hudson, K. M., Bromidge, T. J., *et al.* (1992). Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Trop* 51(2): 123-34.
- Edwards, J. F., Higgs, S. and Beaty, B. J. (1998). Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. *J Med Entomol* 35(3): 261-5.
- Eglezos, A., Andrews, P. V., Boyd, R. L. and Helme, R. D. (1991).

- Tachykinin-mediated modulation of the primary antibody response in rats: evidence for mediation by an NK-2 receptor. *J Neuroimmunol* 32(1): 11-8.
- Ekwanzala, M., Pepin, J., Khonde, N., Molisho, S., Bruneel, H., *et al.* (1996). In the heart of darkness: sleeping sickness in Zaire. *Lancet* 348(9039): 1427-30.
- Ellis, J. A., Shapiro, S. Z., Ole Moi-Yoi, O. and 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(6): 661-7.
- Faudry, E., Lozzi, S. P., Santana, J. M., D'souza-Ault, M., Kieffer, S., *et al.* (2004). *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *J Biol Chem* 279(19): 19607-13.
- Faye, O., Fontenille, D., Gaye, O., Sy, N., Molez, J. F., *et al.* (1995). Malaria and rice growing in the Senegal River delta (Senegal). *Ann Soc Belg Med Trop* 75(3): 179-89.
- Faye, O., Fontenille, D., Herve, J. P., Diack, P. A., Diallo, S., *et al.* (1993). [Malaria in the Saharan region of Senegal. 1. Entomological transmission findings]. *Ann Soc Belg Med Trop* 73(1): 21-30.
- Faye, O., Gaye, O., Konate, L., Molez, J. F., Feller-Dansokho, E., *et al.* (1998). Prediction and prevention of malaria epidemics in the valley of the Senegal River. *Sante* 8(5): 347-52.
- Fernandes, N., Figueiredo, P., Do Rosario, V. E. and Cravo, P. (2007). Analysis of sulphadoxine/pyrimethamine resistance-conferring mutations of *Plasmodium falciparum* from Mozambique reveals the absence of the dihydrofolate reductase 164L mutant. *Malar J* 6: 35.
- Ferreira, B. R. and Silva, J. S. (1998). Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Vet Immunol Immunopathol* 64(3): 279-93.
- Fillinger, U., Knols, B. G. and Becker, N. (2003). Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Trop Med Int Health* 8(1): 37-47.
- Fivaz, B. H. (1989). Immune suppression induced by the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. *J Parasitol* 75(6): 946-52.
- Fontenille, D., Lochouart, L., Diatta, M., Sokhna, C., Dia, I., *et al.* (1997). Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91(6): 647-52.
- Foster, W. A. (1995). Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu Rev Entomol* 40: 443-74.
- Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Pham, V. M., Garfield, M. K. and Ribeiro, J. M. (2002). Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *J Exp Biol* 205(Pt 16): 2429-51.
- Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G. and Ribeiro, J. M. (1999). Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 38(50): 16678-85.
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., *et al.* (2004). Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles*

- mosquitoes. *Cell Microbiol* 6(7): 687-94.
- Gakhar, S. K., Suneja, A. and Adak, T. (2005). Midgut antibodies reduce the reproductive capacity of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Indian J Exp Biol* 43(4): 330-4.
- Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissiere, C., Lejon, V., *et al.* (2000). Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Cote d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop Med Int Health* 5(11): 786-93.
- Gilles, H. M. (1993). Epidemiology of malaria. Bruce-Chwatt's Essential Malariology. H. M. gilles and D. A. Warrell. Oxford, Oxford University Press: 124-163.
- Gillett, J. D. (1967). Natural selection and feeding speed in a blood-sucking insect. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 167(8): 316-29.
- Githeko, A. K., Adungo, N. I., Karanja, D. M., Hawley, W. A., Vulule, J. M., *et al.* (1996). Some observations on the biting behavior of *Anopheles gambiae* s.s., *Anopheles arabiensis*, and *Anopheles funestus* and their implications for malaria control. *Exp Parasitol* 82(3): 306-15.
- Githeko, A. K., Service, M. W., Mbogo, C. M., Atieli, F. K. and Juma, F. O. (1994). Origin of blood meals in indoor and outdoor resting malaria vectors in western Kenya. *Acta Trop* 58(3-4): 307-16.
- Gitlin, D. and Boesman, M. (1966). Serum alpha-fetoprotein, albumin, and gamma-G-globulin in the human conceptus. *J Clin Invest* 45(11): 1826-38.
- Graves, P. and Gelband, H. (2003). Vaccines for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD000129.
- Greenwood, B. (2006). Review: Intermittent preventive treatment--a new approach to the prevention of malaria in children in areas with seasonal malaria transmission. *Trop Med Int Health* 11(7): 983-91.
- Greenwood, B. and Mutabingwa, T. (2002). Malaria in 2002. *Nature* 415(6872): 670-2.
- Grindstaff, J. L., Brodie, E. D., 3rd and Ketterson, E. D. (2003). Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. *Proc Biol Sci* 270(1531): 2309-19.
- Grossman, G. L., Campos, Y., Severson, D. W. and 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(8-9): 769-81.
- Guerin, P. J., Olliaro, P., Nosten, F., Druilhe, P., Laxminarayan, R., *et al.* (2002). Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect Dis* 2(9): 564-73.
- Guillet, P., N'guessan, R., Darriet, F., Traore-Lamizana, M., Chandre, F., *et al.* (2001). Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol* 15(1): 105-12.
- Hall, L. R. and 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(7): 3501-6.
- Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J. M. and Bowman, A. S. (2004). Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role

- in enhanced *Borrelia burgdoferi* transmission. *Immunology* 113(3): 401-8.
- Hatfield, P. R. (1988). Detection and localization of antibody ingested with a mosquito bloodmeal. *Med Vet Entomol* 2(4): 339-45.
- Hawley, W. A., Phillips-Howard, P. A., Ter Kuile, F. O., Terlouw, D. J., Vulule, J. M., *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(4 Suppl): 121-7.
- Haynes, R. K. (2001). Artemisinin and derivatives: the future for malaria treatment? *Curr Opin Infect Dis* 14(6): 719-26.
- Hemingway, J., Field, L. and Vontas, J. (2002). An overview of insecticide resistance. *Science* 298(5591): 96-7.
- Hervy, J.-P., Le Goff, G., Geoffroy, B., Hervé, J.-P., Manga, L., *et al.* (1998). Les anophèles de la région Afro-tropicale.
- Hill, A. V. (2006). Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol* 6(1): 21-32.
- Hirai, M., Wang, J., Yoshida, S., Ishii, A. and Matsuoka, H. (2001). Characterization and identification of exflagellation-inducing factor in the salivary gland of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Biochem Biophys Res Commun* 287(4): 859-64.
- Hoffmann, A., Walsmann, P., Riesener, G., Paintz, M. and Markwardt, F. (1991). Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. *Pharmazie* 46(3): 209-12.
- Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., *et al.* (2002). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298(5591): 129-49.
- Hougard, J. M., Fontenille, D., Chandre, F., Darriet, F., Carnevale, P., *et al.* (2002). Combating malaria vectors in Africa: current directions of research. *Trends Parasitol* 18(7): 283-6.
- Ijumba, J. N., Mwangi, R. W. and Beier, J. C. (1990). Malaria transmission potential of *Anopheles* mosquitoes in the Mwea-Tebere irrigation scheme, Kenya. *Med Vet Entomol* 4(4): 425-32.
- Imbert, P. and Laurent, C. (2002). Treatment of malaria in children: 1. Uncomplicated malaria. *Med Trop (Mars)* 62(5): 554-60.
- Isawa, H., Yuda, M., Orito, Y. and 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(31): 27651-8.
- Jacobs, J. W., Cupp, E. W., Sardana, M. and Friedman, P. A. (1990). Isolation and characterization of a coagulation factor Xa inhibitor from black fly salivary glands. *Thromb Haemost* 64(2): 235-8.
- James, A. A. (1994). Molecular and biochemical analysis of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bulletin Institute Pasteur* 92: 133-150.
- James, A. A. (2005). Gene drive systems in mosquitoes: rules of the road. *Trends Parasitol* 21(2): 64-7.
- James, A. A., Blackmer, K., Marinotti, O., Ghosn, C. R. and 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(2): 245-53.
- Jamonneau, V., Solano, P., Koffi, M., Denizot, M. and Cuny, G. (2004). Apports et limites du diagnostic de la trypanosomiase humaine

- africaine. *Medecine Sciences* 20: 871-875.
- Jamonneau, V., Truc, P., Garcia, A., Magnus, E. and Buscher, P. (2000). Preliminary evaluation of LATEX/T. b. gambiense and alternative versions of CATT/T. b. gambiense for the serodiagnosis of human african trypanosomiasis of a population at risk in Cote d'Ivoire: considerations for mass-screening. *Acta Trop* 76(2): 175-83.
- Jannin, J., Moulia-Pelat, J. P., Chanfreau, B., Penchenier, L., Louis, J. P., *et al.* (1993). [African human trypanosomiasis: study of a scoring system of presumptive diagnosis in the Congo]. *Bull World Health Organ* 71(2): 215-22.
- Janzen, H. G. and Wright, K. A. (1971). The salivary glands of *Aedes aegypti* (L.): an electron microscope study. *Can J Zool* 49(10): 1343-6.
- Jeon, S. H., Park, J. W. and 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(3): 206-12.
- Jonsson, N. N., Matschoss, A. L., Pepper, P., Green, P. E., Albrecht, M. S., *et al.* (2000). Evaluation of TickGARDPLUS, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein-Friesian cows. *Veterinary Parasitology* 88(3-4): 275-285.
- Jordan, S. P., Waxman, L., Smith, D. E. and Vlasuk, G. P. (1990). Tick anticoagulant peptide: kinetic analysis of the recombinant inhibitor with blood coagulation factor Xa. *Biochemistry* 29(50): 11095-100.
- Kalluri, S., Gilruth, P., Rogers, D. and Szczur, M. (2007). Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. *PLoS Pathog* 3(10): 1361-71.
- Kalume, D. E., Okulate, M., Zhong, J., Reddy, R., Suresh, S., *et al.* (2005). A proteomic analysis of salivary glands of female *Anopheles gambiae* mosquito. *Proteomics* 5(14): 3765-77.
- Kamhawi, S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and Infection* 2(14): 1765-1773.
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E. and Sacks, D. (2000). Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290(5495): 1351-4.
- Kester, K. E., McKinney, D. A., Tornieporth, N., Ockenhouse, C. F., Heppner, D. G., *et al.* (2001). Efficacy of recombinant circumsporozoite protein vaccine regimens against experimental *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 183(4): 640-7.
- Killeen, G. F., McKenzie, F. E., Foy, B. D., Schieffelin, C., Billingsley, P. F., *et al.* (2000). A simplified model for predicting malaria entomologic inoculation rates based on entomologic and parasitologic parameters relevant to control. *Am J Trop Med Hyg* 62(5): 535-44.
- Kitron, U. (1998). Landscape ecology and epidemiology of vector-borne diseases: tools for spatial analysis. *J Med Entomol* 35(4): 435-45.
- Kitua, A. Y., Smith, T., Alonso, P. L., Masanja, H., Urassa, H., *et al.* (1996). *Plasmodium falciparum* malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health* 1(4): 475-84.
- Kitua, A. Y., Smith, T. A., Alonso, P. L., Urassa, H., Masanja, H., *et al.* (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(4): 325-33.
- Konate, L., Diop, A., Sy, N., Faye, M. N., Deng, Y., *et al.* (2001). Comeback of Anopheles funestus in Sahelian Senegal. *Lancet* 358(9278): 336.
- Kopecky, J., Kuthejlova, M. and Pechova, J. (1999). Salivary gland extract from Ixodes ricinus ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunol* 21(7): 351-6.
- Kovar, L., Kopecky, J. and Rihova, B. (2001). Salivary gland extract from Ixodes ricinus tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of T lymphocytes in human PBMC culture. *J Parasitol* 87(6): 1342-8.
- Kublin, J. G., Cortese, J. F., Njunju, E. M., Mukadam, R. A., Wirima, J. J., *et al.* (2003). Reemergence of chloroquine-sensitive Plasmodium falciparum malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J Infect Dis* 187(12): 1870-5.
- Kulkarni, M. A., Kweka, E., Nyale, E., Lyatuu, E., Mosha, F. W., *et al.* (2006). Entomological evaluation of malaria vectors at different altitudes in Hai district, northeastern Tanzania. *J Med Entomol* 43(3): 580-8.
- Kuthejlova, M., Kopecky, J., Stepanova, G. and Macela, A. (2001). Tick salivary gland extract inhibits killing of Borrelia afzelii spirochetes by mouse macrophages. *Infect Immun* 69(1): 575-8.
- Kwiatkowski, D. (1999). The molecular genetic approach to malarial pathogenesis and immunity. *Parassitologia* 41(1-3): 233-40.
- Kwiatkowski, D. and Marsh, K. (1997). Development of a malaria vaccine. *Lancet* 350(9092): 1696-701.
- Lancien, J. and Gouteux, J. P. (1987). Le piège pyramidal à mouche tsétsé (Diptera: Glossinidae). *Afrique médicale* 258: 647-652.
- Lane, R. S., Moss, R. B., Hsu, Y. P., Wei, T., Mesirow, M. L., *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(5): 850-9.
- Lanfrancotti, A., Lombardo, F., Santolamazza, F., Veneri, M., Castrignano, T., *et al.* (2002). Novel cDNAs encoding salivary proteins from the malaria vector Anopheles gambiae. *FEBS Lett* 517(1-3): 67-71.
- Lavazec, C. and Bourgoignie, C. (2008). Mosquito-based transmission blocking vaccines for interrupting Plasmodium development. *Microbes Infect* 10(8): 845-9.
- Laveissiere, C. and Grebaut, P. (1990). [The trapping of tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Improvement of a model: the Vavoua trap]. *Trop Med Parasitol* 41(2): 185-92.
- Laveissiere, C., Grebaut, P., Herder, S. and Penchenier, L. (2000). Les glossines vectrices de la trypanosomiase humaine africaine.
- Laveissiere, C., Sane, B., Diallo, P. B., Truc, P. and Meda, A. H. (1997). [Epidemiologic risk of infectious disease transmission in regions of the Ivory Coast]. *Trop Med Int Health* 2(8): 729-32.
- Lavoipierre, M. M. (1965). Feeding mechanism of blood-sucking arthropods. *Nature* 208(5007): 302-3.
- Le Goff, G., Carnevale, P., Fondjo, E. and Robert, V. (1997). Comparison of three sampling methods of man-biting anophelines in order to estimate the malaria transmission in a village of south Cameroon. *Parasite* 4(1): 75-80.

- Le Goff, G., Carnevale, P. and 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(1): 55-60.
- Le Sueur, D., Sharp, B. L., Gouws, E. and Ngxongo, S. (1996). Malaria in South Africa. *S Afr Med J* 86(8): 936-9.
- Lemasson, J. J., Fontenille, D., Lochouart, L., Dia, I., Simard, F., *et al.* (1997). Comparison of behavior and vector efficiency of *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis* (Diptera: Culicidae) in Barkedji, a Sahelian area of Senegal. *J Med Entomol* 34(4): 396-403.
- Lerner, E. A. and Shoemaker, C. B. (1992). Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *J Biol Chem* 267(2): 1062-6.
- Li, S. and Aksoy, S. (2000). A family of genes with growth factor and adenosine deaminase similarity are preferentially expressed in the salivary glands of *Glossina m. morsitans*. *Gene* 252(1-2): 83-93.
- Li, S., Kwon, J. and Aksoy, S. (2001). Characterization of genes expressed in the salivary glands of the tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Mol Biol* 10(1): 69-76.
- Lima, H. C. and 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(12): 5442-5.
- Lindblade, K. A., Walker, E. D., Onapa, A. W., Katungu, J. and Wilson, M. L. (1999). Highland malaria in Uganda: prospective analysis of an epidemic associated with El Nino. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93(5): 480-7.
- Lindsay, S. W., Parson, L. and 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(1399): 847-54.
- Lombardo, F., Lanfrancotti, A., Mestres-Simon, M., Rizzo, C., Coluzzi, M., *et al.* (2006). At the interface between parasite and host: the salivary glands of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Parassitologia* 48(4): 573-80.
- Looareesuwan, S., Ho, M., Wattanagoon, Y., White, N. J., Warrell, D. A., *et al.* (1987). Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med* 317(11): 675-9.
- Lumsden, W. H., Kimber, C. D., Evans, D. A. and Doig, S. J. (1979). *Trypanosoma brucei*: Miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: Adaptation for field use. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73(3): 312-7.
- Lutumba, P., Robays, J., Miaka Mia Bilenge, C., Mesu, V. K., Molisho, D., *et al.* (2005). Trypanosomiasis control, Democratic Republic of Congo, 1993-2003. *Emerg Infect Dis* 11(9): 1382-8.
- Macdonald, G. (1957). The epidemiology and Control of Malaria. London, Oxford University Press.
- Magnus, E., Vervoort, T. and Van Meirvenne, N. (1978). A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. B. gambiense* trypanosomiasis. *Ann Soc Belg Med Trop* 58(3): 169-76.
- Malafronte, R., Dos, S., Calvo, E., James, A. A. and Marinotti, O. (2003). The major salivary gland antigens of *Culex quinquefasciatus* are D7-

- related proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 33(1): 63-71.
- Malkin, E. M., Durbin, A. P., Diemert, D. J., Sattabongkot, J., Wu, Y., *et al.* (2005). Phase 1 vaccine trial of Pvs25H: a transmission blocking vaccine for *Plasmodium vivax* malaria. *Vaccine* 23(24): 3131-8.
- Mant, M. J. and Parker, K. R. (1981). Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in in vitro platelet aggregation. *Br J Haematol* 48(4): 601-8.
- Marinotti, O., De Brito, M. and Moreira, C. K. (1996). Apyrase and alpha-glucosidase in the salivary glands of *Aedes albopictus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 113(4): 675-9.
- Martens, P. and Hall, L. (2000). Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. *Emerg Infect Dis* 6(2): 103-9.
- Matha, V. and Weiser, J. (1988). Detection of antigens common to salivary glands and other tissues of tsetse fly, *Glossina palpalis palpalis* (Diptera: Glossinidae). *Folia Parasitol (Praha)* 35(3): 285-7.
- Mathenge, E. M., Misiani, G. O., Oulo, D. O., Irungu, L. W., Ndegwa, P. N., *et al.* (2005). Comparative performance of the Mbita trap, CDC light trap and the human landing catch in the sampling of *Anopheles arabiensis*, *An. funestus* and culicine species in a rice irrigation in western Kenya. *Malar J* 4: 7.
- Mathenge, E. M., Omweri, G. O., Irungu, L. W., Ndegwa, P. N., Walczak, E., *et al.* (2004). Comparative field evaluation of the Mbita trap, the Centers for Disease Control light trap, and the human landing catch for sampling of malaria vectors in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 70(1): 33-7.
- Mathews, G. V., Sidjanski, S. and 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(4): 417-23.
- Matovu, E., Stewart, M. L., Geiser, F., Brun, R., Maser, P., *et al.* (2003). Mechanisms of arsenical and diamidine uptake and resistance in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* 2(5): 1003-8.
- Mbow, M. L., Bleyenbergh, J. A., Hall, L. R. and 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(10): 5571-7.
- Mbow, M. L., Rutti, B. and 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(1): 254-61.
- Mccall, P. J., Mosha, F. W., Njunwa, K. J. and Sherlock, K. (2001). Evidence for memorized site-fidelity in *Anopheles arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(6): 587-90.
- Mciver, S. B. (1982). Sensilla mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 19(5): 489-535.
- Mehlitz, D., Zillmann, U., Scott, C. M. and Godfrey, D. G. (1982). Epidemiological studies on the animal reservoir of Gambiense sleeping sickness. Part III. Characterization of trypanozoon stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmed Parasitol* 33(2): 113-8.
- Mejri, N., Franscini, N., Rutti, B. and Brossard, M. (2001). Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of

- several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunol* 23(2): 61-9.
- Menon, J. N. and 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(1): 243-9.
- Miezan, T., Doua, F., Cattand, P. and De Raadt, P. (1991). [Evaluation of Testryp CATT applied to blood samples on filter paper and on diluted blood in a focus of trypanosomiasis due to *Trypanosoma brucei gambiense* in the Ivory Coast]. *Bull World Health Organ* 69(5): 603-6.
- Millan, M. J. (1999). The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57(1): 1-164.
- Milleron, R. S., Ribeiro, J. M., Elnaïme, D., Soong, L. and Lanzaro, G. C. (2004). Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 70(3): 278-85.
- Molineaux, L. (1988). The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for its control. *Malaria: principles and practice of malarialogy*. C. Livingstone. London.
- Montfort, W. R., Weichsel, A. and Andersen, J. F. (2000). Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2): 110-8.
- Moore, A. and Richer, M. (2001). Re-emergence of epidemic sleeping sickness in southern Sudan. *Trop Med Int Health* 6(5): 342-7.
- Moore, J. S., Kelly, T. B., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Wallbanks, K. R., *et al.* (1987). Honeydew sugars in wild-caught *Phlebotomus ariasi* detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). *Med Vet Entomol* 1(4): 427-34.
- Moreira-Ferro, C. K., Daffre, S., James, A. A. and Marinotti, O. (1998). A lysozyme in the salivary glands of the malaria vector *Anopheles darlingi*. *Insect Mol Biol* 7(3): 257-64.
- Morris, R. V., Shoemaker, C. B., David, J. R., Lanzaro, G. C. and Titus, R. G. (2001). Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with *Leishmania major* and Vaccinating Against It Protects Against *L. major* Infection. *J Immunol* 167(9): 5226-5230.
- Mouchet, J., Carnevale, P., Coosemans, M., Julvez, J., Manguin, S., *et al.* (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. Paris.
- Muller, O., Traore, C., Kouyate, B., Ye, Y., Frey, C., *et al.* (2006). Effects of insecticide-treated bednets during early infancy in an African area of intense malaria transmission: a randomized controlled trial. *Bull World Health Organ* 84(2): 120-6.
- Murphy, S. C. and 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(1-2 Suppl): 57-67.
- N'guessan, R., Corbel, V., Akogbeto, M. and 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(2): 199-206.

- Naessens, J., Mwangi, D. M., Buza, J. and Moloo, S. K. (2003). Local skin reaction (chancre) induced following inoculation of metacyclic trypanosomes in cattle by tsetse flies is dependent on CD4 T lymphocytes. *Parasite Immunol* 25(8-9): 413-9.
- Nascimento, E. P., Dos Santos Malafronte, R. and Marinotti, O. (2000). Salivary gland proteins of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 43(1): 9-15.
- Nascimento, R. J., Santana, J. M., Lozzi, S. P., Araujo, C. N. and 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(3): 219-26.
- Nevill, C. G., Some, E. S., Mung'ala, V. O., 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(2): 139-46.
- Newton, C. R., Hien, T. T. and White, N. (2000). Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 69(4): 433-41.
- Noeske-Jungblut, C., Haendler, B., Donner, P., Alagon, A., Possani, L., *et al.* (1995). Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J Biol Chem* 270(48): 28629-34.
- Noeske-Jungblut, C., Kratzschmar, J., Haendler, B., Alagon, A., Possani, L., *et al.* (1994). An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J Biol Chem* 269(7): 5050-3.
- Noireau, F., Lemesre, J. L., Nzoukoudi, M. Y., Louembet, M. T., Gouteux, J. P., *et al.* (1988). Serodiagnosis of sleeping sickness in the Republic of the Congo: comparison of indirect immunofluorescent antibody test and card agglutination test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 82(2): 237-40.
- Nwanyanwu, O. C., Kumwenda, N., Kazembe, P. N., Jemu, S., Ziba, C., *et al.* (1997). Malaria and human immunodeficiency virus infection among male employees of a sugar estate in Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91(5): 567-9.
- O'flaherty, J. T. and Cordes, J. F. (1994). Human neutrophil degranulation responses to nucleotides. *Lab Invest* 70(6): 816-21.
- Odiere, M., Bayoh, M. N., Gimnig, J., Vulule, J., Irungu, L., *et al.* (2007). Sampling outdoor, resting *Anopheles gambiae* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya with clay pots. *J Med Entomol* 44(1): 14-22.
- 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(12-13): 1454-62.
- Overath, P., Chaudhri, M., Steverding, D. and Ziegelbauer, K. (1994). Invariant surface proteins in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today* 10(2): 53-8.
- Owhashi, M., Harada, M., Suguri, S., Ohmae, H. and Ishii, A. (2001). The role of saliva of *Anopheles stephensi* in inflammatory response: identification of a high molecular weight neutrophil chemotactic factor. *Parasitol Res* 87(5): 376-82.
- Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A. and Stuart, D. I. (1999). Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol Cell* 3(5): 661-71.

- Palosuo, K., Brummer-Korvenkontio, H., Mikkola, J., Sahi, T. and Reunala, T. (1997). Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to *Aedes* mosquito bites. *Int Arch Allergy Immunol* 114(4): 367-72.
- Pan, F. M., Chang, W. C. and Chiou, S. H. (1994). cDNA and protein sequences coding for the precursor of phospholipase A2 from Taiwan cobra, *Naja naja atra*. *Biochem Mol Biol Int* 33(1): 187-94.
- Parker, K. R. and Mant, M. J. (1979). Effects of tsetse (*Glossina morsitans morsitans* Westw.) (Diptera: Glossinidae) salivary gland homogenate on coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 42(2): 743-51.
- Penchenier, L., Terrasse, C. and Diallo, B. P. (1984). Le contact homme-glossine: réactions immunitaires à la salive de glossine. *communication O.C.C.G.E. n°27/IRTO/RAP/84*.
- Peng, Z., Li, H. and Simons, F. E. (1998). Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. *J Allergy Clin Immunol* 101(4 Pt 1): 498-505.
- Peng, Z. and Simons, F. E. (2004). Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 133(2): 198-209.
- Peng, Z., Yang, M. and 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(3): 259-64.
- Pennetier, C., Corbel, V., Boko, P., Odjo, A., N'guessan, R., *et al.* (2007). Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malar J* 6: 38.
- Penneys, N. S., Nayar, J. K., Bernstein, H., Knight, J. W. and Leonardi, C. (1989). Mosquito salivary gland antigens identified by circulating human antibodies. *Arch Dermatol* 125(2): 219-22.
- Perez De Leon, A. A., Valenzuela, J. G. and 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(2): 121-30.
- Pimentel, G. E. and Rossignol, P. A. (1990). Age dependence of salivary bacteriolytic activity in adult mosquitoes. *Comp Biochem Physiol B* 96(3): 549-51.
- Pino, P., Vouldoukis, I., Kolb, J. P., Mahmoudi, N., Desportes-Livage, I., *et al.* (2003). Plasmodium falciparum--infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis* 187(8): 1283-90.
- Pnltha <http://www.minisanterdc.cd/leministere/pnltha.htm>.
- Poinsignon, A., Cornelié, 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(6): e2472.
- Poinsignon, A., Remoue, F., Rossignol, M., Cornelié, 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(5): 750-3.
- Port, G. R., Boreham, P. F. and Bryan, J. H. (1980). The relationship of host size to feeding by mosquitoes of the *Anopheles gambiae* Giles complex (Diptera: Culicidae).

- bulletin of Entomological Research* 70: 133-144.
- Poulin, R. (1995). "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. *Int J Parasitol* 25(12): 1371-83.
- Prates, D. B., Santos, L. D., Miranda, J. C., Souza, A. P., Palma, M. S., *et al.* (2008). Changes in amounts of total salivary gland proteins of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J Med Entomol* 45(3): 409-13.
- Qureshi, A. A., Asahina, A., Ohnuma, M., Tajima, M., Granstein, R. D., *et al.* (1996). Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg* 54(6): 665-71.
- Ramasamy, M. S., Ramasamy, R., Kay, B. H. and Kidson, C. (1988). Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol* 2(1): 87-93.
- Ramasamy, R., Nagendran, K. and Ramasamy, M. S. (1994). Antibodies to epitopes on merozoite and sporozoite surface antigens as serologic markers of malaria transmission: studies at a site in the dry zone of Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg* 50(5): 537-47.
- Rasooly, R. and Balaban, N. (2004). Trypanosome microtubule-associated protein p15 as a vaccine for the prevention of African sleeping sickness. *Vaccine* 22(8): 1007-15.
- Rawat, D., Chakravarti, A. and Yadav, S. (2001). Comparison of two blood collection techniques for measles antibody detection in children. *Indian J Med Res* 114: 117-20.
- Rbm (1999). The Global Partnership to Roll Back Malaria. Initial period covered July 1998-December 2001. Proposed strategy and workplan. Draft 3.1b/12 July 1999. Geneva, World Health Organisation.
- 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(2-3): 108-15.
- Remoue, F., Cisse, B., Ba, F., Sokhna, C., Herve, J.-P., *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(4): 363-370.
- Remoue, F., Cornelie, S., Ngom, A., Boulanger, D. and Simondon, F. (2005). Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases. Update in tropical immunology. O. Garraud. Fort P.O. Trivandrum, Herala, India, Transworld research Network: 377-400.
- 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(4): 366-71.
- Ribeiro, J. C., Evans, P. M., Macswain, J. L. and Sauer, J. (1992). *Amblyomma americanum*: Characterization of salivary prostaglandins E2 and F2[alpha] by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Experimental Parasitology* 74(1): 112-116.
- Ribeiro, J. M. (1987). *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp Parasitol* 64(3): 347-53.
- Ribeiro, J. M. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol* 32: 463-78.
- Ribeiro, J. M. (1992). Characterization of a vasodilator from the salivary glands

- of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 165: 61-71.
- Ribeiro, J. M. (1995). Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis* 4(3): 143-52.
- Ribeiro, J. M., Endris, T. M. and Endris, R. (1991). Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp Biochem Physiol A* 100(1): 109-12.
- Ribeiro, J. M., Katz, O., Pannell, L. K., Waitumbi, J. and Warburg, A. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J Exp Biol* 202(Pt 11): 1551-9.
- Ribeiro, J. M., Marinotti, O. and Gonzales, R. (1990). A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Br J Pharmacol* 101(4): 932-6.
- Ribeiro, J. M. and Nussenzveig, R. H. (1993). Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *FEBS Lett* 330(2): 165-8.
- Ribeiro, J. M. and Nussenzveig, R. H. (1993). The salivary catechol oxidase/oxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. *J Exp Biol* 179: 273-87.
- Ribeiro, J. M., Rossignol, P. A. and Spielman, A. (1984). Role of mosquito saliva in blood vessel location. *J Exp Biol* 108: 1-7.
- Ribeiro, J. M., Rossignol, P. A. and Spielman, A. (1985). *Aedes aegypti*: model for blood finding strategy and prediction of parasite manipulation. *Exp Parasitol* 60(1): 118-32.
- Ribeiro, J. M., Sarkis, J. J., Rossignol, P. A. and Spielman, A. (1984). Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp Biochem Physiol B* 79(1): 81-6.
- Ribeiro, J. M., Schneider, M. and 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. and 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(6): 2251-7.
- Ribeiro, J. M. C., Rossignol, P. A. and Spielman, A. (1985). Salivary gland apyrase determines probing time in anopheline mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* 31(9): 689-692.
- Rickman, L. S., Jones, T. R., Long, G. W., Paparello, S., Schneider, I., *et al.* (1990). *Plasmodium falciparum*-infected *Anopheles stephensi* inconsistently transmit malaria to humans. *Am J Trop Med Hyg* 43(5): 441-5.
- Ringwald, P., Dubois, B., Le Bras, J. and 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(4): 442-6.
- Robays, J., Bilengue, M. M., Van Der Stuyft, P. and Boelaert, M. (2004). The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Trop Med Int Health* 9(5): 542-50.
- Robert, V., Dieng, H., Lochouran, L., Traore, S. F., Trape, J. F., *et al.* (1998). Malaria transmission in the rural zone of Niakhar, Senegal. *Trop Med Int Health* 3(8): 667-77.
- Rodhain F, P. C. (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Paris.

- Rogers, D. (1979). Tsetse Population Dynamics and Distribution: A New Analytical Approach. *The Journal of Animal Ecology* 48(3): 825-849.
- Rogers, D. J. (2000). Satellites, space, time and the African trypanosomiases. *Adv Parasitol* 47: 129-71.
- Rogers, D. J. (2006). Models for vectors and vector-borne diseases. *Adv Parasitol* 62: 1-35.
- Rogers, D. J., Hay, S. I. and Packer, M. J. (1996). Predicting the distribution of tsetse flies in West Africa using temporal Fourier processed meteorological satellite data. *Ann Trop Med Parasitol* 90(3): 225-41.
- Rogers, D. J. and Randolph, S. E. (1985). Population ecology of tsetse. *Annu Rev Entomol* 30: 197-216.
- Rogers, K. A. and 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(3): 127-34.
- Rogier, C., Henry, M. C. and Spiegel, A. (2001). [Diagnosis of malaria attacks in endemic areas: theoretical aspects and practical implications]. *Med Trop (Mars)* 61(1): 27-46.
- Rogier, C., Tall, A., Diagne, N., Fontenille, D., Spiegel, A., *et al.* (1999). Plasmodium falciparum clinical malaria: lessons from longitudinal studies in Senegal. *Parassitologia* 41(1-3): 255-9.
- Rohousova, I. and Volf, P. (2006). Sand fly saliva: effects on host immune response and Leishmania transmission. *Folia Parasitol (Praha)* 53(3): 161-71.
- Rojkjaer, R. and Schmaier, A. H. (1999). Activation of the plasma kallikrein/kinin system on endothelial cell membranes. *Immunopharmacology* 43(2-3): 109-14.
- Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Del Sero, G., *et al.* (1997). Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J Immunol* 158(11): 5349-56.
- Rosenberg, R. (1985). Inability of Plasmodium knowlesi sporozoites to invade Anopheles freeborni salivary glands. *Am J Trop Med Hyg* 34(4): 687-91.
- Rossignol, P. A. and Lueders, A. M. (1986). Bacteriolytic factor in the salivary glands of Aedes aegypti. *Comp Biochem Physiol B* 83(4): 819-22.
- Rossignol, P. A., Ribeiro, J. M. and Spielman, A. (1984). Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 33(1): 17-20.
- 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(2): 178-80.
- Rubio-Palis, Y. and Curtis, C. F. (1992). Evaluation of different methods of catching anopheline mosquitoes in western Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc* 8(3): 261-7.
- Saji, F., Samejima, Y., Kamiura, S. and Koyama, M. (1999). Dynamics of immunoglobulins at the fetomaternal interface. *Rev Reprod* 4(2): 81-9.
- Sarkis, J. J., Guimaraes, J. A. and Ribeiro, J. M. (1986). Salivary apyrase of Rhodnius prolixus. Kinetics and purification. *Biochem J* 233(3): 885-91.
- Sarr, J. B., Remoue, F., Samb, B., Dia, I., Guindo, S., *et al.* (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. and Essenberg, R. C. (1995). Tick salivary gland physiology. *Annu Rev Entomol* 40: 245-67.
- Schneider, B. S., Mcgee, C. E., Jordan, J. M., Stevenson, H. L., Soong, L., *et al.* (2007). Prior Exposure to Uninfected Mosquitoes Enhances Mortality in Naturally-Transmitted West Nile Virus Infection. *PLoS ONE* 2(11): e1171.
- Schneider, B. S., Soong, L., Girard, Y. A., Campbell, G., Mason, P., *et al.* (2006). Potentiation of West Nile encephalitis by mosquito feeding. *Viral Immunol* 19(1): 74-82.
- Schwartz, B. S., Ribeiro, J. M. and Goldstein, M. D. (1990). Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132(1): 58-66.
- Sergent, E. (1950). Definition of immunity & premunity. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 79(5): 786-97.
- Service, M. (1977). A critical review of procedures for sampling populations of adult mosquitoes. *bulletin of Entomological Research* 67: 343-382.
- Seyoum, A., Balcha, F., Balkew, M., Ali, A. and Gebre-Michael, T. (2002). Impact of cattle keeping on human biting rate of anopheline mosquitoes and malaria transmission around Ziway, Ethiopia. *East Afr Med J* 79(9): 485-90.
- Shanks, G. D., Ragama, B. O. and Oloo, A. J. (1999). Time to reappearance of malaria parasites following various drug treatment regimens in a holoendemic area of western Kenya. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93(3): 304-5.
- Shattil, S. J., Ginsberg, M. H. and Brugge, J. S. (1994). Adhesive signaling in platelets. *Curr Opin Cell Biol* 6(5): 695-704.
- Sherman, I. W., Eda, S. and Winograd, E. (2003). Cytoadherence and sequestration in *Plasmodium falciparum*: defining the ties that bind. *Microbes Infect* 5(10): 897-909.
- Simarro, P. P., Jannin, J. and Cattand, P. (2008). Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS Med* 5(2): e55.
- Simarro, P. P., Sima, F. O., Mir, M., Mateo, M. J. and Roche, J. (1991). Control of human African trypanosomiasis in Luba in equatorial Guinea: evaluation of three methods. *Bull World Health Organ* 69(4): 451-7.
- Simister, N. E. (2003). Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 21(24): 3365-9.
- Simo, G., Mansinsa Diabakana, P., Kande Betu Ku Mesu, V., Manzambi, E. Z., Ollivier, G., *et al.* (2006). Human African trypanosomiasis transmission, Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Emerg Infect Dis* 12(12): 1968-70.
- Sithiprasasna, R., Jaichapor, B., Chanaimongkol, S., Khongtak, P., Lealsirivattanakul, T., *et al.* (2004). Evaluation of candidate traps as tools for conducting surveillance for *Anopheles* mosquitoes in a malaria-endemic area in western Thailand. *J Med Entomol* 41(2): 151-7.
- Smartt, C. T., Kim, A. P., Grossman, G. L. and James, A. A. (1995). The Apyrase gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, is expressed specifically in the adult female salivary glands. *Exp Parasitol* 81(3): 239-48.
- Smith, D. L., Dushoff, J. and McKenzie, F. E. (2004). The risk of a mosquito-borne infection in a heterogeneous environment. *PLoS Biol* 2(11): e368.
- Smith, T., Killeen, G., Lengeler, C. and Tanner, M. (2004). Relationships between the outcome of

- Plasmodium falciparum infection and the intensity of transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 71(2 Suppl): 80-6.
- Smith, T. A., Leuenberger, R. and Lengeler, C. (2001). Child mortality and malaria transmission intensity in Africa. *Trends Parasitol* 17(3): 145-9.
- Snounou, G., Gruner, A. C., Muller-Graf, C. D., Mazier, D. and Renia, L. (2005). The Plasmodium sporozoite survives RTS,S vaccination. *Trends Parasitol* 21(10): 456-61.
- Snow, R. W., Guerra, C. A., Noor, A. M., Myint, H. Y. and Hay, S. I. (2005). The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 434(7030): 214-7.
- Snow, R. W., Molyneux, C. S., Warn, P. A., Omumbo, J., Nevill, C. G., *et al.* (1996). Infant parasite rates and immunoglobulin M seroprevalence as a measure of exposure to Plasmodium falciparum during a randomized controlled trial of insecticide-treated bed nets on the Kenyan coast. *Am J Trop Med Hyg* 55(2): 144-9.
- Solano, P., Jamonneau, V., N'guessan, P., N'dri, L., Dje, N. N., *et al.* (2002). Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of Human African Trypanosomosis in Cote d'Ivoire. *Acta Trop* 82(3): 349-56.
- Srikrishnaraj, K. A., Ramasamy, R. and Ramasamy, M. S. (1995). Antibodies to Anopheles midgut reduce vector competence for Plasmodium vivax malaria. *Med Vet Entomol* 9(4): 353-7.
- Stanghellini, A. and Josenando, T. (2001). The situation of sleeping sickness in Angola: a calamity. *Trop Med Int Health* 6(5): 330-4.
- Stark, K. R. and 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(33): 20802-9.
- Stassens, P., Bergum, P. W., Gansemans, Y., Jespers, L., Laroche, Y., *et al.* (1996). Anticoagulant repertoire of the hookworm Ancylostoma caninum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5): 2149-54.
- Stevens, W. J., Van Den Abbeele, J. and Bridts, C. H. (1996). Anaphylactic reaction after bites by Glossina morsitans (tsetse fly) in a laboratory worker. *J Allergy Clin Immunol* 98(3): 700-1.
- Stoute, J. A., Slaoui, M., Heppner, D. G., Momin, P., Kester, K. E., *et al.* (1997). A preliminary evaluation of a recombinant circumsporozoite protein vaccine against Plasmodium falciparum malaria. RTS,S Malaria Vaccine Evaluation Group. *N Engl J Med* 336(2): 86-91.
- Stowers, A. W., Cioce, V., Shimp, R. L., Lawson, M., Hui, G., *et al.* (2001). Efficacy of two alternate vaccines based on Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 in an Aotus challenge trial. *Infect Immun* 69(3): 1536-46.
- Struik, S. S. and Riley, E. M. (2004). Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev* 201: 268-90.
- Suneja, A., Gulia, M. and Gakhar, S. K. (2003). Blocking of malaria parasite development in mosquito and fecundity reduction by midgut antibodies in Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 52(2): 63-70.
- Suwan, N., Wilkinson, M. C., Crampton, J. M. and Bates, P. A. (2002). Expression of D7 and D7-related proteins in the salivary glands of the human malaria mosquito Anopheles stephensi. *Insect Mol Biol* 11(3): 223-32.

- Takken, W. and Knols, B. G. (1999). Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 44: 131-57.
- Theodos, C. M., Ribeiro, J. M. and Titus, R. G. (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice. *Infect Immun* 59(5): 1592-8.
- Theodos, C. M. and Titus, R. G. (1993). Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function in vitro. *Parasite Immunol* 15(8): 481-7.
- Titus, R. G., Bishop, J. V. and 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(4): 131-41.
- Titus, R. G. and Ribeiro, J. M. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance Leishmania infectivity. *Science* 239(4845): 1306-8.
- Touray, M. G., Seeley, D. C., Jr. and Miller, L. H. (1994). Plasmodium gallinaceum: differential lysis of two developmental stages of malaria sporozoites by the alternative pathway of complement. *Exp Parasitol* 78(3): 294-301.
- Trager (1939). Acquired immunity to ticks. *J. parasitol* 25: 137-139.
- Trape, J. F. (2001). Limits of impregnated bednets for malaria control in tropical Africa. *Bull Soc Pathol Exot* 94(2 Pt 2): 174-9.
- Trape, J. F. (2001). The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *Am J Trop Med Hyg* 64(1-2 Suppl): 12-7.
- Trape, J. F., Lefebvre-Zante, E., Legros, F., Druilhe, P., Rogier, C., et al. (1993). Malaria morbidity among children exposed to low seasonal transmission in Dakar, Senegal and its implications for malaria control in tropical Africa. *Am J Trop Med Hyg* 48(6): 748-56.
- Treutiger, C. J., Hedlund, I., Helmby, H., Carlson, J., Jepson, A., et al. (1992). Rosette formation in Plasmodium falciparum isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg* 46(5): 503-10.
- Truc, P., Jamonneau, V., Cuny, G. and Frezil, J. L. (1999). Use of polymerase chain reaction in human African trypanosomiasis stage determination and follow-up. *Bull World Health Organ* 77(9): 745-8.
- Ulloa, A., Arredondo-Jimenez, J. I., Rodriguez, M. H. and Fernandez-Salas, I. (2002). Mark-recapture studies of host selection by Anopheles (Anopheles) vestitipennis. *J Am Mosq Control Assoc* 18(1): 32-5.
- Urioste, S., Hall, L. R., Telford, S. R., 3rd and 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(3): 1077-85.
- Ursing, J., Kofoed, P. E., Rodrigues, A., Rombo, L. and Gil, J. P. (2007). Plasmodium falciparum genotypes associated with chloroquine and amodiaquine resistance in Guinea-Bissau. *Am J Trop Med Hyg* 76(5): 844-8.
- Valenzuela, J. G. (2002). High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochem Mol Biol* 32(10): 1199-209.
- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Garfield, M. K., Mendez, S., Kamhawi, S., et al. (2001). Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med* 194(3): 331-42.

- Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Rowton, E. and 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(Pt 2): 229-37.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Galperin, M. Y. and 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(46): 30583-90.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Gonzalez, E. C., De Miranda-Santos, I. K., Marinotti, O., *et al.* (2002). The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Mol Biol* 11(2): 149-55.
- Valenzuela, J. G., Francischetti, I. M., Pham, V. M., Garfield, M. K. and Ribeiro, J. M. (2003). Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Biochem Mol Biol* 33(7): 717-32.
- Valenzuela, J. G., Francischetti, I. M. and Ribeiro, J. M. (1999). Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry* 38(34): 11209-15.
- Valenzuela, J. G. and Ribeiro, J. M. (1998). Purification and cloning of the salivary nitrophorin from the hemipteran *Cimex lectularius*. *J Exp Biol* 201(Pt 18): 2659-64.
- Vallely, A., Vallely, L., Changalucha, J., Greenwood, B. and 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., *et al.* (2007). The *Glossina morsitans* tsetse fly saliva: general characteristics and identification of novel salivary proteins. *Insect Biochem Mol Biol* 37(10): 1075-85.
- Van Nieuwenhove, S., Betu-Ku-Mesu, V. K., Diabakana, P. M., Declercq, J. and Bilenge, C. M. (2001). Sleeping sickness resurgence in the DRC: the past decade. *Trop Med Int Health* 6(5): 335-41.
- Vaughan, J. A., Scheller, L. F., Wirtz, R. A. and Azad, A. F. (1999). Infectivity of *Plasmodium berghei* sporozoites delivered by intravenous inoculation versus mosquito bite: implications for sporozoite vaccine trials. *Infect Immun* 67(8): 4285-9.
- Vickerman, K. (1985). Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br Med Bull* 41(2): 105-14.
- Vickerman, K., Tetley, L., Hendry, K. A. and Turner, C. M. (1988). Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biol Cell* 64(2): 109-19.
- Volf, P. and Rohousova, I. (2001). Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122 Pt 1: 37-41.
- Vreysen, M. J. B., Saleh, K. M., Zhu, Z. R. and Suleiman, F. W. (2000). Responses of *Glossina austeni* to sticky panels and odours. *Med Vet Entomol* 14(3): 283-9.
- 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(1): 66-73.
- Waitumbi, J. and Warburg, A. (1998). *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infect Immun* 66(4): 1534-7.
- Wanasen, N., Nussenzveig, R. H., Champagne, D. E., Soong, L. and 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(2): 191-9.
- Wanderley, D. M., De Carvalho, M. E., Ferreira, C. S., Massucato, M. A. and Tognoli, S. P. (1982). Comparison of the results of indirect immunofluorescence reactions performed in the diagnosis of malaria using blood samples collected on filter paper and in capillary tubes. *Rev Bras Malariol Doencas Trop* 34: 87-92.
- Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G. C., Titus, R. G. and 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(1312): 223-30.
- Wasserman, H. A., Singh, S. and Champagne, D. E. (2004). Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*, modulates murine lymphocyte function. *Parasite Immunology* 26(6-7): 295-306.
- Waxman, L. and Connolly, T. M. (1993). Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem* 268(8): 5445-9.
- Webster, H. K., Gingrich, J. B., Wongsrichanalai, C., Tulyayon, S., Suvarnamani, A., *et al.* (1992). Circumsporozoite antibody as a serologic marker of *Plasmodium falciparum* transmission. *Am J Trop Med Hyg* 47(4): 489-97.
- Weichsel, A., Andersen, J. F., Champagne, D. E., Walker, F. A. and Montfort, W. R. (1998). Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect. *Nat Struct Biol* 5(4): 304-9.
- Wekesa, J. W., Copeland, R. S. and 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(4): 484-8.
- White, N. J., Chapman, D. and Watt, G. (1992). The effects of multiplication and synchronicity on the vascular distribution of parasites in falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86(6): 590-7.
- White, N. J. and Ho, M. (1992). The pathophysiology of malaria. *Adv Parasitol* 31: 83-173.
- Who (1990). Severe and complicated malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84 Suppl 2: 1-65.
- Who (1996). Weekly epidemiological record: 17-22.
- Who (2000). Drug resistance of malaria parasites. Geneva.
- Who (2006). Paludisme: lutte anti-vectorielle et protection personnelle.
- Who (2006). Weekly epidemiological record: 69-80.
- Who (2008). World Malaria Report. Geneva, WHO.
- Who, T. D. R. U. (2001). Committee on African Trypanosomiasis Scientific Working group on African trypanosomiasis (sleeping sickness).
- Wikel, S. K., Ramachandra, R. N., Bergman, D. K., Burkot, T. R. and 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(1): 335-8.
- Willadsen, P. and Jongejans, F. (1999). Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol Today* 15(7): 258-62.
- Yoshida, S. and Watanabe, H. (2006). Robust salivary gland-specific

- transgene expression in *Anopheles stephensi* mosquito. *Insect Mol Biol* 15(4): 403-10.
- Yuval, B. (1992). The other habit-sugar feeding by mosquitoes. *Bull Soc For Vector Ecology* 17: 150-156.
- Zeidner, N. S., Higgs, S., Happ, C. M., Beaty, B. J. and 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(1): 35-44.
- Zhang, Y., Ribeiro, J. M., Guimaraes, J. A. and Walsh, P. N. (1998). Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-X activating complex. *Biochemistry* 37(30): 10681-90.

Publications et Communications personnelles

Publications

☛ **Poinsignon A.**, Cornelie S., Mestres-Simon M., Lanfrancotti A., Rossignol M., Boulanger D., Cisse B., Sokhna C., Arcà B., Simondon F. et Remoue F. 2008. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles bites*. *PLoS ONE* 3 (6): e2472.

☛ **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 epidemiological marker of exposure to Glossina bites. *Am J Trop Med Hyg* 78: 750-753.

☛ **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.

Communications orales lors de congrès

☛ **Poinsignon A.**, Cornelie S., Mestres-Simon M., Lanfrancotti A., Rossignol M., Boulanger D., Cisse B., Sokhna C., Arcà B., Simondon F., Remoue F. Identification of an Immunological Marker of Exposure to *Anopheles gambiae s.l.* Bites based on a Peptide Design of the gSG6 Salivary Protein. Xth European Multicolloquium of Parasitology (EMOP), 24-29 août 2008, Paris, France.

☛ **Poinsignon A.** gSG6, une protéine salivaire d'*Anopheles gambiae*, candidate marqueur d'exposition à la piqure du vecteur du paludisme? 17th Conference of the African Association of Insect Scientists (AAIS), 11-15 juin 2007, Dakar, Sénégal.

☛ **Poinsignon A.**, Cornélie S., Remoué F., Grébaut P., Courtin D., Garcia A. & Simondon F. Diversité et fonctions des protéines salivaires chez les arthropodes vecteurs : Etude de la relation immune homme/vecteur au cours de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) Invitation au Congrès de la Société Française de Parasitologie suite au prix Anofel 2005 récompensant la thèse de Doctorat de Pharmacie, 8-10 juin 2006, Bordeaux, France.

☛ Remoué F., Cornélie S., **Poinsignon A.**, Doucouré S., Sow C., NDiaye A., NGom M., Boulanger D. et Simondon F. Immuno-épidémiologie de la relation homme/vecteur au cours des maladies à transmission vectorielle: vers l'identification d'un marqueur d'exposition? Congrès International de Parasitologie de la Société Ouest Africaine de Parasitologie, 22-26 mai 2006, Dakar, Sénégal.

☛ **Poinsignon A.**, Cornélie S., Courtin D., Grébaut P., Garcia A., Simondon F., Remoué F.. Human-vector immunological relationships during sleeping sickness: identification of immunogenic salivary proteins of *Glossina spp.* 6^{ème} Congrès de la Fédération Africaine des Sociétés d'Immunologie, 20-23 mars 2006, Dakar, Sénégal.

Communications orales

☛ **Poinsignon A.**, Remoué F.. Immuno-épidémiologie de la relation homme/vecteur au cours du paludisme: Réponse anticorps spécifique aux antigènes salivaires du vecteur, un marqueur immuno-épidémiologique d'exposition à piqûre et/ou de risque de maladies? 9 avril 2008, IRD-UR010, Faculté de pharmacie Paris V, France.

☛ **Poinsignon A.** Vers un marqueur d'exposition spécifique de la piqûre d'*Anopheles spp.* Mosquito Salivary Network I, 10-11 mars 2008, Marseille, France.

☛ **Poinsignon A.** Réponse anticorps spécifique aux antigènes salivaires de *Glossina spp.*: vers un marqueur d'exposition au vecteur?, Mosquito Salivary Network I, 10-11 mars 2008, Marseille, France.

☛ **Poinsignon A.**, Etude de la relation immune homme-vecteur au cours de la Trypanosomiase Humaine Africaine: Réponse anticorps spécifique aux antigènes salivaires de *Glossina spp.*: vers un marqueur d'exposition au vecteur?, Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), 21 janvier 2008, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso.

☛ **Poinsignon A.**, Remoué F.. Immuno-épidémiologie de la relation homme/vecteur au cours du paludisme: Réponse anticorps spécifique aux antigènes salivaires d'*Anopheles* comme marqueur immuno-épidémiologique d'exposition/risque de paludisme ? Séminaire de clôture du Master International d'Entomologie Médicale et Vétérinaire, 23 novembre 2007, Cotonou, Bénin.

☛ Arcà B., Lombardo F., Mestres M., Rizzo C., **Poinsignon A.**, Remoue F., Simondon F., Ribeiro J.M.C., Coluzzi M.. The mosquito salivary glands: Transcriptome, RNAi and Salivary antigens.B. Cluster meeting in the frame of the EU BioMalPar Network. 2006 Oxford, UK.

☛ **Poinsignon A.**, Remoué F, Cornélie S., Courtin D., Grébaut P., Cuny G., Garcia A., Simondon F., Remoué F.. Relation immunologique homme-vecteur au cours de la Trypanosomiase Humaine Africaine : Identification des protéines salivaires immunogéniques de *Glossina spp.* Réunion du Réseau Epidémiologie et Développement (RED-IRD), septembre 2005, Paris, France.

Communication sous forme de poster

☛ **Poinsignon A.**, Cornélie S., Mestres-Simon M., Lanfrancotti A., Rossignol M., Boulanger D., Cisse B., Sokhna C., Arcà B., Simondon F., Remoue F. Relation immunologique Homme-Vecteur : Vers un marqueur immuno-épidémiologique d'exposition spécifique aux piqûres d'*Anopheles gambiae*. Congrès de l'école doctorale CBS2, mai 2008, Montpellier, France.

Résumé

Le paludisme et la trypanosomiase humaine africaine sont des problèmes majeurs de santé publique en Afrique sub-saharienne. La mesure de l'exposition des populations humaines aux piqûres des insectes vecteurs est un paramètre épidémiologique essentiel à définir dans le cadre de la lutte contre la transmission des maladies vectorielles. Dans ce contexte, par une approche immuno-épidémiologique et en exploitant les propriétés immunogéniques des protéines salivaires des insectes vecteurs, notre objectif était d'identifier et de valider des candidats salivaires permettant d'évaluer le risque d'exposition des populations humaines aux piqûres d'*Anopheles spp.* et de *Glossina spp.*.

Dans le cadre de la trypanosomiase humaine africaine, nous avons montré que la réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux de glossines représente un marqueur d'exposition permettant de discriminer une personne exposée au non aux piqûres des glossines. Par ailleurs, la composition en protéines salivaires immunogéniques des glossines semble dépendante de l'espèce glossinienne (vectrice ou non) et leur immunogénicité chez les populations humaines semble dépendante du statut d'exposition (exposé ou non) et infectieux (infecté ou non) de ces individus. Dans le cadre du paludisme, nous avons identifié et validé le peptide gSG6-P1 spécifique d'*Anopheles spp.* comme marqueur d'exposition à *An. gambiae* par une approche originale basée sur des outils de bio-informatique et immuno-épidémiologiques. En complément, ce marqueur semble particulièrement adapté pour évaluer l'exposition des populations dans des contextes de faible densité anophélienne (paludisme urbain, paludisme d'altitude) et une première étape validant son utilité dans l'évaluation de l'efficacité des stratégies de lutte anti-vectorielle a été ainsi initiée.

Cette thèse contribue à une meilleure connaissance des relations immunes homme-vecteur au cours de deux pathologies majeures. Cette approche pourrait être développée à d'autres maladies à transmission vectorielle émergentes ou ré-émergentes (arboviroses) tant dans les pays du Sud que du Nord.

Mots clés: bio-marqueur, paludisme, trypanosomiase humaine africaine, *Anopheles*, *Glossina*, relation immunologique homme-vecteur, protéines salivaires.

Ж Ж Ж

Human –vector relationship From the identification to the validation of salivary proteins like immunologic marker of exposure to *Anopheles spp.* and *Glossina spp.* bites

Summary

Malaria and the human african trypanosomiasis are currently major public health problems in sub-Saharan Africa. The evaluation of exposure of the human populations to vector bites is an essential epidemiological parameter to improve vector-borne diseases control. In this way, by an immuno-epidemiological approach and by using immunological properties of salivary proteins of vectors, the objective was to identify and to validate salivary candidates for evaluating the exposure risk of human populations to *Anopheles spp.* and *Glossina spp.* bites.

Concerning the human african trypanosomiasis, we have demonstrated that the specific IgG response to *Glossina* whole saliva extracts, represents a marker of exposure allowing discrimination of exposed individual to *Glossina* bites or not. In addition, the composition in immunogenic salivary proteins seems dependent on the *Glossina* species (vector or not) and their immunogenicity in human populations seems specific to the exposure (exposed or not) and infectious status (infected or not) of individuals.

Concerning malaria, we have identified and validated the *Anopheles spp.* specific gSG6-P1 peptide as a marker of *An. gambiae* exposure with an original approach based on bio-informatic and immuno-epidemiological tools. This marker seems to be particularly appropriate in the evaluation of exposure in a context of low *Anopheles* density (highland, urban malaria) and a first stage in its validation like tool for the evaluation of the efficacy of anti-vectorial strategies was launched.

This thesis strengthens the knowledge of the human-vector immune relationship within these two major diseases. Such approach could be applied to other vector borne diseases, as emerging or re-emerging diseases (arbovirus diseases) in South or North countries.

Key words: bio-marker, malaria, human african trypanosomiasis, *Anopheles*, *Glossina*, human-vector immune relationship, salivary proteins.