



**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE**

Année universitaire 2009- 2010

Thèse N°...../M

THESE

**ETUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE AUX  
EXTRAITS SALIVAIRES DE *Phlebotomus  
duboscqi* DANS LA COMMUNE RURALE DE  
BAGOUÉ**

Présentée et soutenue

publiquement le 20/02/2010

devant la Faculté de Médecine de  
JURY

**Président : Pr Sékou Fantamadi TRAORE**

**Membres Pr Boubacar TRAORE**

**Dr Mahamadou DIAKITE**

**DEDICACE**

**ET**

**REMERCIEMENTS**

Je dédie cet événement marquant de ma vie à la mémoire de notre regretté mère Feue Kadiatou Dembélé. Tu as été une mère très adorable, dévouée, déterminée, modeste. Tu t'es sacrifiée pour notre éducation, notre désir le plus ardent était de te voir parmi nous aujourd'hui mais Dieu le tout Puissant en a décidé autrement en t'arrachant à notre affection. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !

Au tout puissant ALLAH, le Clément, le Miséricordieux, Lumière des cieux Louange à toi. Nous implorons ton pardon et nous prions pour que tu nous assistes dans tous nos actes quotidiens. Que tu nous montres le droit chemin. Amen!

Qu'il me soit permis aujourd'hui de remercier toutes les personnes qui ont rendu possible la présente étude sous quelque forme que ce soit:

✓ **A notre père Lamine TRAORE**

Aucun mot ne pourrait traduire le profond amour que j'ai pour toi ce travail est le fruit de tes bénédictions. Merci pour tes conseils, ton sens de l'honneur, ta rigueur dans le travail nous sont toujours inspirées. Puisse Allah vous accorder longue vie pour que nous puissions encore profiter de ton conseil et ton soutien infailible.

✓ **A tous mes Frères et Sœurs.**

Vos soutiens, vos encouragements fraternels et familiaux ne m'ont pas manqué. Que Dieu nous donne le bonheur, l'entente, la solidarité et qu'il renforce nos liens sanguins. Ce travail doit être une fierté familiale.

✓ **A mes Beaux frères et Belles Sœurs.**

Une pensée très spéciale pour vous qui m'ont toujours encouragé, ils ont toujours été là pour moi sans faille, je vous remercie de tout mon cœur.

✓ **A tous mes neveux, nièces, cousins, cousines**

La voie qui mène au bonheur est dure très dure, courage, dévouement et vigilance à tout moment. Que Dieu vous donne longue vie pour aller aussi loin que possible que je n'ai pu atteindre.

✓ **A mes tantes et oncles**

Vos encouragements et vos soutiens ne m'ont jamais fait défauts. Que Dieu vous donne longue vie pour aller aussi loin que possible que je n'ai pu atteindre.

✓ **Mes encadreurs**

Pr. Yéya Tiémoko Touré, Pr Sangaré Constance Soucko, Pr Sékou F. Traoré, Pr Seydou Doumbia, Dr Mamadou Coulibaly, Dr Mamadou Diakité, Dr Nafomon Sogoba, Dr. Mahamadou Touré, Dr. Yaya Coulibaly, Dr Djibril Sangaré, Dr Ibrahim Baber Maïga, Dr Sibiry Samaké, Dr. Benoît Dembélé, Mr Ibrahim Moussa Sissoko, Mr Cheick Amadou Coulibaly, Je tiens à vous exprimer ma sincère gratitude pour m'avoir initié dans cet immense champ qui est « la recherche ». Merci pour nos discussions, ainsi que pour ma présence au long de ces années, de votre disponibilité et de votre amitié.

✓ **A Dr. Sakai et Souleymane Karambé**

Je vous remercie pour m'avoir chaleureusement accueilli au sein de l'équipe de recherche ainsi que pour votre confiance.

✓ **A mes amis (es)**

Merci d'être toujours près de moi, vous étiez la bouffée d'oxygène qui me ressourçait dans les moments de solitude où l'on a terriblement besoin d'un petit mot, d'un petit geste, aussi humble soit-il, de soutien moral.

- ✓ **Tous mes promotionnaires du 1<sup>er</sup> cycle jusqu'à l'université**
- ✓ **A toute la population de Sougoula et Kéména**
- ✓ **Le club CAUSES de la FMPOS**

Que de bons moments passés ensemble durant toutes ces années...

✓ **A mes aînés et aux internes du MRTC**

Dr Boubacar GUINDO, Dr Sibiry SAMAKE, Dr Bréhima DIALLO, Dr Danaya KONE, Dr Housseini DOLO, Dr Souleymane DIARRA, Dr Yaya KASSOGUE, Dr Bréhima DIAKITE, Dr Madjou SACKO, Dr Amadou GUINDO, Dr Mohamed Moumine TRAORE, Dr Siaka KONATE, Dr Siaka Yamoussa COULIBALY, Dr Daouda DIALLO, Mr Dansiné Diarra, Dr M'Bouyé DIALLO, merci, bon courage et bonne chance pour le reste du chemin à parcourir.

✓ **Aux personnels du CNAM**

Principalement au Pr. Somita KEÏTA, Dr Ousmane Faye, Dr. Pierre Traore, Dr. Karim COULIBALY, Moumine CISSE, Guimba et Tall K.

✓ **Au NIAID/LMVR/LMB**

Je voudrais exprimer ma reconnaissance aux personnes avec lesquelles j'ai eu le plaisir de travailler durant ces années, en particulier Jesus Venezuela; Shaden Kamhawi; Phill Lawyer; Fabiano Oliveira; Jennifer M Anderson; Regis Gomes; Clarissa Teixeira; Ryan Jochim; Claudio Menez et Blanca Paccha. Je vous remercie de m'avoir accueilli chaleureusement au sein de l'Unité de Recherche (LMVR/LMB) aux Etats Unis sans laquelle la réalisation du présent travail aurait été des plus difficiles.

✓ **Aux informaticiens du laboratoire**

M. Sidy SOUMARE, M. Mady DIARRA, M. Amadou DIALLO et Mme SOUMARE Salimata TRAORE, merci pour votre disponibilité.

✓ **Aux personnels de l'officine TOMBWA**

Principalement Dr Abdoulaye Dembélé, M. Pasani Dembélé, M. Fy Koné, M Karamoko Dembélé et Alou Dembélé, Je ne cesserai jamais de vous remercier pour votre bonne collaboration et vos courtoisies.

✓ **Aux chauffeurs et manœuvres du MRTC/DEAP**

Que ceux qui ne sont pas nommés ici me pardonnent, s'ils ont été oubliés, ce n'est que par l'écrit.

# HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

✓ **A notre maître et président de jury**

**Professeur Sékou F Traoré,**

PhD en entomologie médicale,

Responsable de l'enseignement de biologie cellulaire à la FMPOS.

Chef de la section entomologie du MRTC

Co-directeur du MRTC

Cher maître, malgré les prérogatives qui sont siennes, vous avez accepté sans réserve, de présider ce jury. Votre grande expérience en entomologie médicale et votre rigueur dans la recherche est incontournable pour l'amélioration qualitative de ce travail. Veuillez accepter cher maître l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

✓ **A notre Maître et juge de Thèse**

**Professeur Boubacar TRAORE**

Docteur en Pharmacie,

PhD en parasitologie-mycologie,

Responsable de l'unité "Paludisme et Grossesse" du laboratoire d'Immunologie-pathologie parasitaire du MRTC/DEAP

Cher maître, la spontanéité avec la quelle vous avez accepté de juger ce travail nous a profondément touché.

Que vous soyez remercié d'avoir accepté, sans réserve aucune, d'évaluer cette thèse à sa juste valeur, et de me faire part de vos remarques sûrement pertinentes qui, avec un peu de recul, contribueront, sans nul doute, au perfectionnement du présent travail.

✓ **A notre Maître et juge de Thèse**

**Docteur Mahamadou DIAKITE**

Docteur en Pharmacie,

PhD en Immuno-Génomique humaine,

Chef de l'unité Immuno-Génomique du MRTC.

Cher maître, votre disponibilité constante et vos qualités scientifiques très remarquables nous conforte à plus d'un titre. Dès notre contact, nous avons gardé l'image d'un homme ouvert, impartial et dévoué au travail.

Que vous soyez remercié d'avoir accepté, sans réserve aucune, d'évaluer cette thèse à sa juste valeur, et de me faire part de vos remarques sûrement pertinentes qui, avec un peu de recul, contribueront, sans nul doute, au perfectionnement du présent travail.

✓ **A notre Maître et directeur de Thèse**

**Professeur Seydou DOUMBIA**

PhD en épidémiologie et spécialiste en santé publique.

Directeur adjoint du MRTC

Co-Principal Investigateur du projet leishmaniose cutanée au Mali

Cher maître, je vous exprime ma sincère gratitude pour m'avoir initié dans cet immense champ qui est «la recherche».

La sagesse, l'esprit d'ouverture de dialogue et la sérénité qui vous animent sont pour nous des valeurs cardinales à rechercher. Qu'il nous soit permis aujourd'hui de dire combien nous sommes heureux et fiers d'être votre élève.

# ABBREVIATIONS

**DEFINITION DES ABREVIATIONS ET SIGLES**

%:	Pourcentage
µm:	micromètre
Ac:	Anticorps
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADP:	Adénosine Di Phosphate
An:	Anophele
ATP:	Adenosine triphosphate
AMP:	Adenosine monohosphate
ASP:	Aspirateur à bouche
BCA:	Acide bicinchonimique
BSA:	Sérum albumine bovine
CD4+:	Cluster de différenciation 4 activée
TCD8+:	Cluster de différenciation 8 activée
Ca <sup>2+</sup> :	Calcium activé
Cm:	Centimètre
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CNAM:	Centre national d'appuie à la lutte contre la maladie
CPA:	Cellules présentatrices d'antigène
°C:	Derge Celsius
DEAP:	Département d'épidémiologie des affections parasitaires.
DO:	Densité optique
ELISA:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F:	Sérum frais
FMPOS:	Faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie
g:	Gramme
HK:	High molecular weight Kininogen
IFI:	Immunofluorescence Indirecte
IFN-g:	Interferon-g
IgM:	Immunoglobine M
IgE:	Immunoglobine E
IgG:	Immunoglobine G

IL:	Interleukine 12
IM:	Intra musculaire
J:	Jour
kDa:	Kilodalton
KE:	Kéména
Kg:	Kilogramme
LACK:	<i>Leishmania</i> homologue of the receptor for activated C kinase
LC:	Leishmaniose cutanée
LCD:	Leishmaniose cutanée diffuse
LCM:	Leishmaniose muco-cutanée
LV:	Leishmaniose viscérale
LB:	lymphocytes B
LT:	Lymphocytes T
L:	<i>Leishmania</i>
LST:	Leishmanin skin test
MAX:	Maxidilian
MD:	Maryland
mg:	milligramme
Mg 2+:	Magnésium
MGG:	May-Grünwald-Giemsa
mm:	Millimètre
MØ:	Monocytes/Macrophages
MRTC:	Malaria Research and Training Center
N:	Nombre total
NIH:	National Institutes of Health
NK:	Naturel killer
NNN:	Novy – Neal - Nicolle
OMS:	Organisation mondiale de la santé
ONG:	Organisation non gouvernementale
P:	<i>Phlebotomus</i>
PBS:	Phosphate buffer saline
PCR:	Polymérase chaine réaction
PpSP15:	Protéine salivaire de <i>Phlebotomus papatasi</i>

S:	<i>Sergentomyia</i>
SG:	Sougoula
SPSS:	Statistic package social science
TBS:	Tris buffer saline
TCB:	Tampon de bicarbonate de carbonate
TNF $\alpha$ :	Tumor Necrosis Factor alpha
Th1:	Lymphocyte T auxiliaires 1 (T-helper)
Th2:	Lymphocyte T auxiliaires 2 (T-helper)
TXA $_2$ :	Thromboxane A $_2$
WHO:	World health organization
TDR	Tropical Diseases Research

## SOMMAIRE

<b>1-Introduction</b> .....	1
<b>2-Objectif</b> .....	3
2.1-Objectif général.....	3
2.2-Objectifs spécifiques.....	3
<b>3-GENERALITE</b> .....	4
3.1-Historique de la leishmaniose.....	4
3.1.1-Taxonomie et morphologie du vecteur.....	4
3.2-Identification et taxonomie des parasites du genre <i>Leishmania</i> .....	5
3.3-Epidémiologie de la leishmaniose.....	6
3.3.1-Répartition géographique de la leishmaniose cutanée au Mali.....	8
3.3.2-Réservoirs de parasite de la leishmaniose cutanée.....	10
3.4-Cycle de transmission de la leishmaniose cutanée.....	10
3.4.1-Parasite chez l'hôte mammifère.....	11
3.4.2-Parasite chez le phlébotome.....	11
3.5-Physiopathologie de la leishmaniose cutanée .....	12
3.6-Relation immunologique homme-vecteur.....	13
3.6.1-Quelques rôles pharmacologiques des protéines salivaires des phlébotomes.....	15
3.6.1.1-Inhibition de l'agrégation plaquettaire.....	15
3.6.1.2-Inhibition de la coagulation.....	16
3.6.1.3-Vasodilatation.....	16
3.6.1.4-Inhibition de la réaction inflammatoire.....	16
3.6.2-Immunomodulation par la salive: de la réponse immune innée à la réponse adaptative.....	17
3.6.3-Effet d'une pré-exposition répétée aux antigènes salivaires des vecteurs sur le développement de l'infection.....	19
3.7-Diagnostic de la leishmaniose cutanée.....	20
3.7.1-Diagnostic d'orientation ou clinique.....	20
3.7.2-Diagnostic biologique.....	20
3.7.2.1-Mise en évidence du parasite.....	20
3.7.2.2-L'examen direct après coloration.....	19

3.7.2.3-Culture :.....	21
3.7.2.4-PCR.....	21
3.7.2.5-Sérologie.....	22
3.7.2.6-Diagnostic immunologique.....	22
3.7.2.7-Intradermoréaction à la leishmanine ou réaction de Monténégro (LST).....	22
3.8-3.8-Traitement des leishmanioses.....	23
3.8.1-Médicaments .....	23
3.8.1.1-Sels d'antimoine pentavalents (SbV) .....	23
3.8.1.2-Sels de pentamidine.....	23
3.8.1.3-Amphotéricine B et ses formulations lipidiques .....	24
3.8.1.5-Autres traitements.....	24
3.8.2-Indications.....	24
3.8.2.1-Leishmaniose cutanée.....	24
3.8.3-Moyens.....	25
3.8.4-Thermothérapie.....	25
3.9-Prophylaxie des réservoirs et des vecteurs.....	25
3.9.1-Prophylaxie individuelle.....	26
3.10-Approche vaccinale.....	26
<b>4-MEHODOLOGIE</b> .....	24
4.1-Cadre d'étude.....	28
4.2-Historique des sites d'étude.....	29
4.2.1-Relief.....	30
4.2.2-Climat.....	30
4.2.3-Végétation.....	30
4.2.4 La faune.....	31
4.3-Population d'étude.....	32
4.4-Type et période d'étude.....	32
4.5-Echantillonnage.....	32
4.5.1-Critères d'inclusion.....	33
4.5.2-Critères de non inclusion.....	33
4.6-Collecte des données.....	34

4.6.1-Prélèvement de sang.....	35
4.6.2-Identification des arthropodes hématophages.....	35
4.6.3-Extraction de la glande salivaire des arthropodes hématophages.....	35
4.6.4-Obtention de l'homogénat de la glande salivaire.....	36
4.6.5-Contrôle de qualité des pools salivaires.....	36
4.6.5.1-Dosage des protéines totales.....	36
4.6.5.2-Electrophorèse sur gel .....	36
4.6.6-Dosage du taux d'anticorps anti-salive de <i>P. duboscqi</i> par ELISA.....	37
4.6.6.1-Principe du test.....	37
4.6.7-Détermination de la spécificité du taux d'anticorps anti-salive <i>P. duboscqi</i> .....	38
4.6.7.1-Analyse de réaction croisée par la technique d'ELISA.....	38
4.6.7.1.1-Mode opératoire.....	38
4.6.7.2-Analyse de réaction croisée par la technique de Western blot.....	39
4.6.7.2.1-Migration des protéines salivaires.....	39
4.6.7.2.2-Transfert des protéines sur la membrane.....	39
4.6.7.2.3-Blocage.....	39
4.6.7.2.4-Anticorps primaire.....	40
4.6.7.2.5-Anticorps secondaire.....	40
4.6.7.2.5-Révélation des protéines salivaires.....	40
4.7-Gestion et analyse des données.....	40
4.8-Considérations éthiques.....	41
<b>5-RESULTATS</b> .....	42
5.1-Caractéristiques sociodémographiques de l'échantillon.....	42
µg/paire.....	43
5.2-Répartition du nombre de paires de glandes salivaires par arthropodes hématophages et la concentration protéique des pools.....	43
5.2.1-Dosage des protéines totales dans la salive.....	44
5.2.2-Analyse de l'expression des protéines salivaires.....	44
5.3-Détermination du taux anticorps anti-salive de <i>P. duboscqi</i> dans la population de Sougoula et de Kéména.....	45

5.5-Détermination de la spécificité de l'anticorps anti-salive de <i>P. duboscqi</i> .....	48
5.5.1-Analyse de réaction croisée entre les protéines salivaires de <i>P. duboscqi</i> et <i>An gambiae sl</i> ou de <i>C. quinquefascatus</i> .....	51
5.5.1.1-Analyse de réaction croisée par la technique d'ELISA.....	51
5.5.1.2-Analyse de réaction croisée par la technique par Western Blot.....	53
<b>6-Commentaires et discussion</b> .....	56
<b>7-Conclusion et recommandations</b> .....	60
<b>8-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	61
<b>9-Annexes</b> .....	66

## LA LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1-</b> <i>Phlebotomus duboscqi</i> .....	5
<b>Figure 2:</b> Carte de distribution de la leishmaniose.....	8
<b>Figure 3:</b> Répartition géographique des cas de la leishmaniose cutanée recensée au CNAM au Mali par cercle de 2005 à 2008.....	10
<b>Figure 4:</b> Diagramme schématisé du cycle de vie de <i>Leishmania</i> .....	12
<b>Figure 5:</b> Localisation de la commune de Barouéli et les villages d'étude sur la carte du Mali.....	29
<b>Figure 6:</b> Diagramme de traitement des échantillons.....	34
<b>Figure 7:</b> Paire de glandes salivaires de <i>P. duboscqi</i> adulte femelle.....	36
<b>Figure 8:</b> Image de glandes salivaires d' <i>An. gambiae sl</i> adulte femelle.....	36
<b>Figure 9:</b> Concentration des échantillons salivaires en duplicata.....	44
<b>Figure 10:</b> Expression des protéines salivaires sur le gel.....	45
<b>Figure 11:</b> Taux d'anticorps IgG anti-salive de <i>P. duboscqi</i> par village.....	46
<b>Figure 12:</b> Taux d'IgG anti-salive de <i>P. duboscqi</i> de selon le sexe des sujets.....	47
<b>Figure 13:</b> Corrélation entre le taux d'IgG anti-salive de <i>P. duboscqi</i> et sujets l'âge.....	48
<b>Figure 14:</b> Taux d'IgG anti-salive aux différentes espèces ( <i>P. duboscqi</i> ; <i>An. gambiae sl</i> et <i>Culex quinquefasciatus</i> ).....	49
<b>Figure 15:</b> Corrélation entre le taux d'IgG anti-salive d' <i>An. gambiae sl</i> et celle de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	50
<b>Figure 16:</b> Corrélation entre le taux d'IgG anti-salive des trois arthropodes.....	50
<b>Figure 17:</b> Analyse de réaction croisée entre les protéines salivaires de <i>P. duboscqi</i> et celles d' <i>An. gambiae sl</i> par ELISA.....	52
<b>Figure 18:</b> Analyse de réaction croisée entre les protéines salivaires de <i>P. duboscqi</i> et de <i>Culex quinquefasciatus</i> par ELISA.....	53
<b>Figure 19:</b> Western blot avec les extraits salivaires d' <i>An. gambiae sl</i> , de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	54
<b>Figure 20:</b> Western blot avec les extraits salivaires de <i>P. duboscqi</i> .....	55

**LA LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I</b> -Classement systématique du genre <i>Leishmania</i> .....	5
<b>Tableau II</b> -Espèces et sous-espèces du genre <i>Leishmania</i> .....	6
<b>Tableau III</b> : Répartition géographique de la leishmaniose cutanée établie par test cutané à la leishmane au Mali en 1967.....	9
<b>Tableau IV</b> : Répartition de l'échantillon par village et par sexe.....	42
<b>Tableau V</b> : Répartition de la population d'étude par tranches d'âge.....	43
<b>Tableau VI</b> : Nombre de paires de glandes salivaires et la concentration en µg/paire.....	43

# INTRODUCTION

## 1-Introduction

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires dues au genre *Leishmania*, protozoaires transmis par la piqûre d'insectes appelés phlébotomes (genre *Phlebotomus* dans l'ancien monde et *Lutzomyia* dans le nouveau monde) [1]. Il existe plus de 20 espèces de *Leishmania*, dont une douzaine sont associées à différentes formes de leishmanioses [2].

Les leishmanioses sont endémiques dans 88 pays et menacent 350 millions de personnes. D'après les estimations de L'OMS, 12 millions de personnes sont atteintes et 2 millions de nouveaux cas se produisent chaque année [3]. La plupart des formes de leishmaniose sont des zoonoses. Les humains ne sont que secondairement infectés. Selon la présentation clinique, la leishmaniose peut être classée en 3 groupes: i] La leishmaniose viscérale (LV) ou kala-azar, qui est caractérisée par une fièvre irrégulière prolongée, une splénomégalie et une perte de poids, sévit au Bangladesh, au Brésil, en Inde, en Afrique de l'Est particulièrement au Soudan et au Kenya [3]; ii] la leishmaniose muco-cutanée (LCM) ou espundia, pouvant entraîner une destruction tissulaire, principalement au niveau du nez et de la bouche, est présente en Bolivie, au Brésil et au Pérou [3]; iii] La leishmaniose cutanée (LC) ou Bouton d'Orient qui se manifeste par des lésions cutanées uniques ou multiples sur les parties découvertes du corps. Les lésions peuvent spontanément guérir et laisser une cicatrice excavée. Elle est présente en Afghanistan, en Arabie Saoudite, au Brésil, au Pérou, au moyen et proche orient et en Afrique [1, 3].

Au Mali, les études sur la répartition de la leishmaniose ont montré l'existence de la leishmaniose cutanée dans plusieurs localités du Mali [4-11]. L'incidence annuelle de la Leishmaniose cutanée a été estimée, à partir de donnée du service de dermatologie du Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie (CNAM) en 2003 à 6,27 cas pour 1000 dossiers de malades. Jusqu'à ce jour, la forme cutanée reste la seule forme décrite au Mali [9, 12]. Une étude récente effectuée en zone sahélienne de Barouéli, a

trouvé une prévalence de 31% de l'infection à *Leishmania major* estimé par le test cutané à leishmanine (LST). L'incidence annuelle de l'infection dans cette zone variait de 5-15% [13]. En outre, *Phlebotomus. duboscqi* a été identifié comme le principal vecteur de la maladie dans cette zone [11].

Le traitement de la leishmaniose cutanée fait appel à des médications non dénuées d'effets secondaires nécessitant une prise en charge par une équipe spécialisée. Face à cette situation, la recherche d'un vaccin contre cette maladie est une alternative attractive. En effet, l'exposition initiale aux antigènes salivaires (injection d'extraits salivaires ou piqûres de phlébotomes) induirait une augmentation d'IFN $\gamma$  et semble protéger contre l'infection [14-16]. Ces observations ont donné l'espoir pour une vaccination avec des composantes de la salive des Phlébotomes pour inhiber la transmission des leishmanies. Ainsi, deux protéines salivaires (Maxadilan de *Lutzomyia longipalpis* et PpSP15 de *Phlebotomus papatasi*) impliquées dans ce phénomène pourraient constituer des vaccins potentiels [16-18].

Cependant, la spécificité de ces protéines salivaires aux phlébotomes reste à démontrer. En effet, elles pourraient être présentes dans la salive d'autres arthropodes hématophages cohabitant dans les mêmes localités que phlébotomes. Une possibilité de réaction croisée entre espèces ou genres différents d'insectes peut être envisagée.

D'où l'intérêt d'étudier la spécificité d'anticorps anti-salivaires des extraits salivaires totaux de *P. duboscqi*. Les résultats de cette étude permettront d'évaluer le potentiel des anticorps anti-salivaires comme marqueur d'exposition aux piqûres de phlébotome.

## **2-Objectifs**

### **2.1-Objectif général**

→ Etudier la réponse immunitaire aux extraits salivaires totaux de *P. duboscqi* en zone endémique de la leishmaniose cutanée.

### **2.2-Objectifs spécifiques**

→ Déterminer le taux d'anticorps IgG anti-salive de *P. duboscqi* dans la population de Sougoula et de Kéména.

→ Evaluer les relations entre le taux IgG anti-salive de *P. duboscqi* et les caractéristiques sociodémographiques.

→ Déterminer la spécificité de la réponse anticorps IgG anti-salive de *P. duboscqi* des sujets vivants à Kéména et à Sougoula.

### **3-GENERALITE**

#### **3.1-Historique de la leishmaniose**

Le parasite, *Leishmania* fut découvert par Sir William Leishman en 1900 dans des frottis de la rate d'un soldat mort à Dum-Dum en Inde. En 1903, Charles Donovan, en poste dans un service médical indien, identifia le même parasite dans une biopsie de la rate. Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leur hommage [2].

L'étude de la transmission de la leishmaniose connaîtra une avancée significative en 1921 grâce aux travaux d'infection expérimentale sur l'homme (avec des phlébotomes infectés) réalisés à l'Institut Pasteur d'Alger dirigé à l'époque par les frères Edmond et Etienne Sergent et leurs collaborateurs. Trois ans plus tard, Knowless *et al* (1924), dérivèrent les différentes étapes de l'évolution du parasite (espèce et genre) dans le tube digestif de *P. argentipes* gorgé sur un malade atteint de leishmaniose viscérale.

##### **3.1.1-Taxonomie et morphologie du vecteur**

Les vecteurs de la leishmaniose sont des insectes qui appartiennent à l'ordre des Diptères, à la famille des Psychodidae et à la sous-famille des Phlebotominae, comportant environ 700 espèces. Seuls les genres *Lutzomyia* et *Phlebotomus* se trouvent impliqués dans la transmission des leishmanioses. Le premier se subdivise en 16 sous-genres et le second en 8 [19]. Le genre *Phlebotomus* se rencontre dans les régions subtropicales, arides et semi-arides de l'Asie, de l'Afrique et du sud de l'Europe. Le genre *Lutzomyia* est présent dans les régions tropicales et subtropicales de l'Amérique [20].

Ces insectes sont de petites tailles. Ils mesurent environ 3 mm de long, possèdent un corps mince et allongé. Leurs couleurs s'étendent du jaunâtre au noir. Seules les femelles sont hématophages (nécessaire à la ponte des œufs) et responsables de la transmission de la leishmaniose (Figure 1) [21].

Leur durée de vie est fonction de la température et de l'humidité. En général, les femelles vivent entre deux semaines à deux mois [19].



**Figure 1-** *Phlebotomus duboscqi* [www.algerie-dz.com]

### 3.2-Identification et taxonomie des parasites du genre *Leishmania*

Les agents responsables de la leishmaniose parasitaire appartiennent à la famille des Trypanosomatidae et à l'ordre des Kinetoplastida. Depuis la description du genre *Leishmania* par Ross en 1903, les différentes classifications ont été proposées, dont celle ci-dessous proposée par Levine et collaborateurs en 1980 [2, 19] (Tableau I).

**Tableau I-** Classement systématique du genre *Leishmania* [2]

Règne	Protista
Sous-règne	Protozoa
Embranchement	Sarcomastigophora
Classe	Zoomastigophorea
Ordre	Kinetoplastida
Sous Ordre	Trypanosomatina
Famille	Trypanosomatidae
Genre	<i>Leishmania</i>

Le développement du parasite dans le tube digestif du vecteur (au niveau du pylore) est le critère qui a permis de diviser le genre *Leishmania* en deux sous-genres. D'une part, la section Suprapylaria, caractérisée par la multiplication dans l'intestin moyen et antérieur, devient le sous-genre *Leishmania*. D'autre part, la section Peripylaria, caractérisée par la multiplication dans la partie postérieure suivie d'une migration antérieure, devient le sous-genre *Vannia* [19].

Le genre *Leishmania* est composé de plusieurs espèces morphologiquement similaires. Elles causent une panoplie de manifestations cliniques allant d'affections cutanées qui se résorbent d'elles-mêmes à des infections viscérales fatales en passant par des exacerbations inflammatoires causant de graves défigurations. Ce genre regroupe habituellement les espèces de *Leishmania* en « complexes » selon les similarités biochimiques (Tableau II).

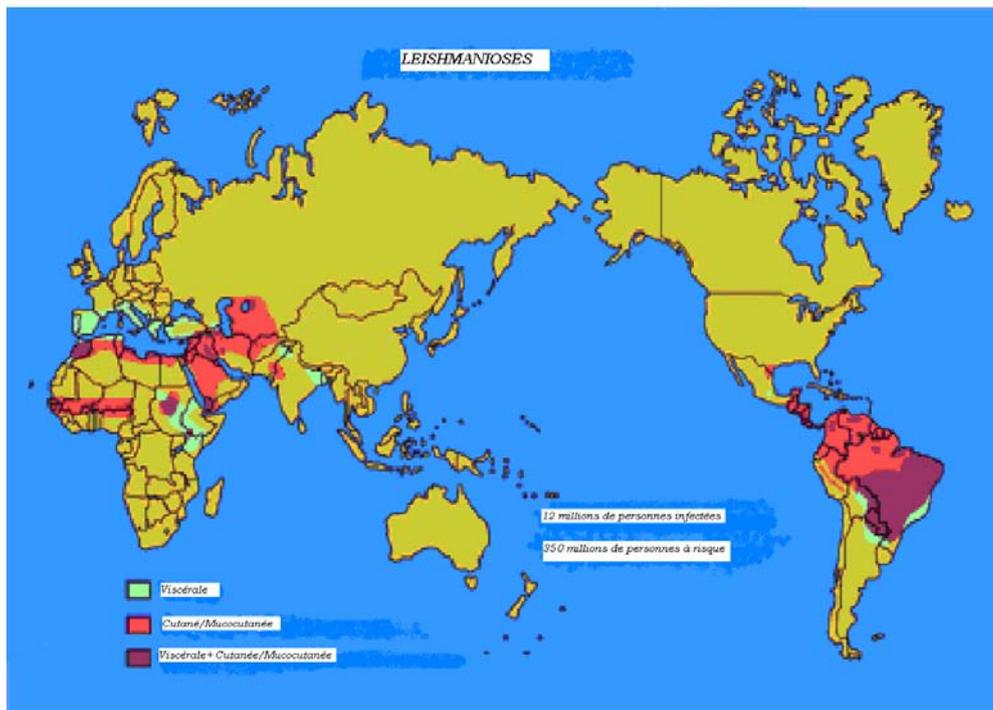
**Tableau II-** Espèces et sous-espèces du genre *Leishmania* [2]

Sous-genre <i>Leishmania</i>	Espèces
Complexe: <i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i> ; <i>L. archibaldi</i>
Complexe: <i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> ; <i>L. chagasi</i>
Complexe: <i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i> ; <i>L. killicki</i>
Complexe: <i>L. major</i>	<i>L. major</i>
Complexe: <i>L. gerbilli</i>	<i>L. gerbilli</i>
Complexe: <i>L. Arabica</i>	<i>L. Arabica</i>
Complexe: <i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>
Complexe: <i>L. Mexicana</i>	<i>L. mexicana</i> ; <i>L. amazonensis</i> ; <i>L. venezuelensis</i>
Complexe: <i>L. enrietti</i>	<i>L. enrietti</i>
Complexe: <i>L. hertigi</i>	<i>L. hertigi</i> ; <i>L. deanei</i>
Sous-genre <i>Viannia</i>	<i>L. Viannia</i>

### 3.3-Epidémiologie de la leishmaniose

Actuellement, 20 espèces du genre *Leishmania* sont connues responsables de cette maladie et sont distribuées le long des régions tropicales et subtropicales dans 88 pays de quatre continents. Selon les données statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé, dans les régions endémiques 350 millions d'individus sont à risque d'infection, 12 millions sont atteints et 1,5 à 2 millions de nouveaux cas sont recensés par an. Les formes cutanées de cette maladie touchent environ 1 à 1,5 millions de personnes chaque année et la forme viscérale 0,5 millions d'individus [22, 23]. Dans les différentes régions, l'augmentation des cas de leishmaniose a pris une ampleur importante. Par exemple pour les cas de leishmaniose cutanée au Brésil 21 800 individus étaient atteints en 1998. Ce chiffre est passé à 40 000 en 2002. La même pathologie à Kaboul, en Afghanistan, a touché 14200 personnes en 1994 et en 2002, 65 000 cas étaient recensés. De même à Ouagadougou, au Burkina Faso, le nombre de cas de la leishmaniose cutanée a augmenté de 28 cas en 1995 à 2375 cas en 2000. Pour la leishmanie viscérale au nord du Brésil en 1998 il y a eu 1 840 cas et 6 000 cas en 2002 ont été enregistrés [24].

Le nombre de cas de L.C contractés en Guyane en 2003 s'est élevé à 269. Trente sept souches isolées ont été identifiées. L'espèce *L. guyanensis* a été l'espèce la plus fréquemment identifiée, avec 25 souches (13 de zymodème MON-45, sept de zymodème MON-131, un de zymodème MON-47, et quatre de zymodème non précisés). Toutefois sept souches de *L. braziliensis* ont été identifiées (six de zymodème MON-43 et un de zymodème MON-44) [25].



**Figure 2:** Carte de distribution de la leishmaniose [26]

### 3.3.1-Répartition géographique de la leishmaniose cutanée au Mali

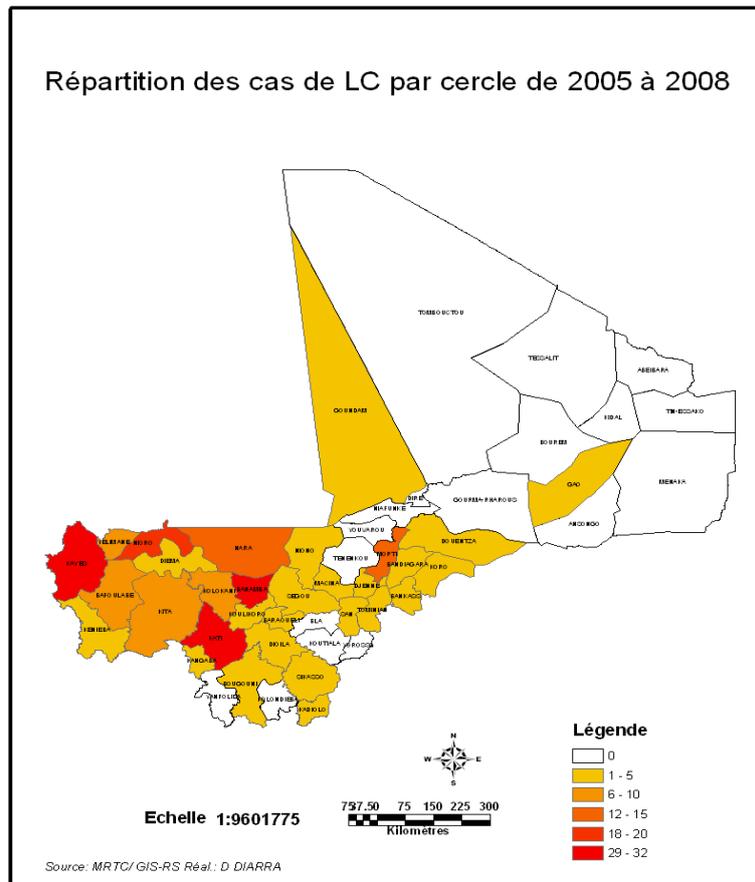
La recherche sur la leishmaniose est une activité qui remonte depuis avant 1957-1958 au Mali. Seule la forme cutanée a été décrite. Elle est causée principalement par *L. major*. Les complications habituelles de la maladie sont les surinfections microbiennes et les lymphangites qui sont souvent rencontrées [9, 12]. La leishmaniose cutanée est une maladie rurale. Elle peut se présenter sous plusieurs formes cliniques et tous les âges sont concernés [9, 27]. L'utilisation du premier test cutané « *leishmanin skin test* » au Mali (test immunologique semblable à celui de Mantoux) en 1967 a permis d'établir une répartition géographique de la leishmaniose au Mali (Tableau III).

Les données actuelles sur la leishmaniose cutanée qui sont répertoriées au seul centre national d'appui à la maladie (CNAM) ne refléteraient qu'en partie l'ampleur de la pathologie au Mali (Figure 3). L'absence de cas

cliniquement notifiés ne peut exclure l'existence de la LC dans une localité [6].

**Tableau III:** Répartition géographique de la leishmaniose cutanée établie par test cutané à la leishmane au Mali en 1967. (Source ministère de la santé et des affaires sociales, 1967).

Région	Nbre testé	Nbre positif	% positif
Bamako	344	60	17,4
Ségou	112	34	30,4
Sikasso	89	27	33,3
Kayes	101	26	25,7
Mopti	64	25	39,1
Gao	56	10	17,9
Ville de Bamako	105	90	12,7
Total	1469	274	18,1



**Figure 3:** Répartition géographique des nombres de cas de la leishmaniose cutanée recensée au CNAM au Mali par cercle de 2005 à 2008.

### 3.3.2-Réservoirs de parasite de la leishmaniose cutanée

La leishmaniose cutanée est qualifiée d'anthroponoses ou de zoonoses selon que l'humain soit l'hôte direct ou accidentel. En effet, certains vecteurs sont attirés par l'homme alors que la majorité à plutôt tendance à piquer d'autres mammifères. Les réservoirs présents dans le nouveau monde sont entre autres les paresseux, les lapins, les primates et les chauves-souris. Dans l'ancien monde, en Afrique et particulièrement en Afrique de l'ouest, ce sont surtout les petits rongeurs et les chiens [2].

### 3.4-Cycle de transmission de la leishmaniose cutanée

Le parasite *leishmania* a un cycle de vie qui nécessite deux hôtes, le phlébotome et un mammifère (Figure 4).

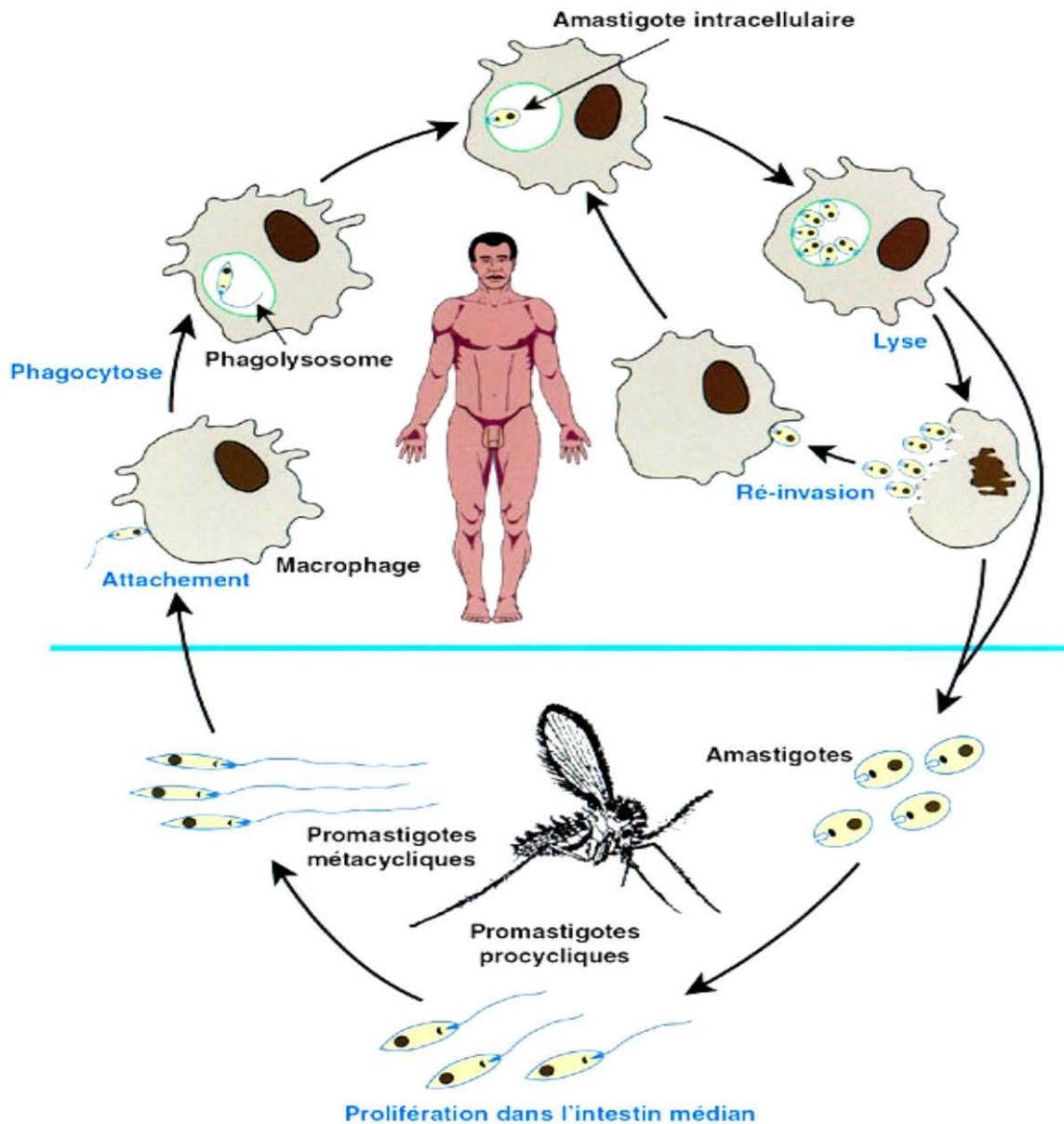
### 3.4.1-Parasite chez l'hôte mammifère

Pendant que la femelle infectée prend son repas de sang un hôte mammifère, elle salive au site de piqûre et régurgite par la même occasion les parasites sous forme promastigote. Cette forme est allongée et très mobile à cause de la flagelle antérieure qu'elle possède. Ils sont ensuite phagocytés par les macrophages (MØ) du système-réticulo-endothélial et se transforment en parasites amastigotes. En ce moment, ils deviennent ovoïdes, mesurent 2,5 à 5 microns de diamètre avec un très court flagelle et ne sont plus mobiles. Les parasites se multiplient par division binaire dans le phagolysosome du phagocyte qui est finalement lysé et affectent ensuite différents tissus selon les types de leishmanioses. Le cycle est complet lorsque le vecteur prend un repas sanguin au site d'infection et aspire des phagocytes contenant de *leishmania* [26].

### 3.4.2-Parasite chez le phlébotome

Les phlébotomes sont infectés lors d'un autre repas de sang pris sur un mammifère infecté en ingérant des macrophages envahis de parasites d'amastigotes. Dans l'intestin de l'arthropode, les parasites se différencient à nouveau en promastigotes après 12 à 18 heures. Ils sont d'abord au stade pro-cyclique où ils se divisent activement mais ne sont pas infectieux. Des promastigotes plus allongés et mobiles, appelés nectomonades, commencent à apparaître après 4 jours et s'attachent aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian par leurs flagelles. A partir du 7ème jour, les parasites migrent vers la partie antérieure de l'intestin médian jusqu'à la valve du stomodaeum qui sépare l'intestin médian de l'avant du système digestif. Les nectomonades se transforment alors en haptomonades (plus petits et plus arrondis) puis en promastigotes méta-cycliques (qui ne se divisent plus, sont plus minces avec un long flagelle et sont hautement mobiles). C'est cette forme qui est infectieuse pour les mammifères. La valve du stomodaeum se dégrade et permet la migration des méta cycliques vers l'œsophage, le pharynx et le proboscis. On pense que ce sont ces parasites qui sont transmis aux mammifères lors du repas sanguin [17, 26].

Les promastigotes sont allongés, long de 8-24 x 4-5  $\mu\text{m}$  avec un flagelle de 10 à 15  $\mu\text{m}$  et très mobiles. Le kinétoplaste est situé à la base du flagelle.



**Figure 4:** Diagramme schématisé du cycle de vie de *Leishmania* [26].

### 3.5-Physiopathologie de la leishmaniose cutanée

La salive du phlébotome favorise les premières étapes de l'infection car elle contient des substances pharmacologiques actives qui produisent une vasodilatation et une immunodépression locales. L'interaction entre des

leishmanies et des macrophages repose sur la reconnaissance des molécules de surface du parasite par divers récepteurs présents sur la membrane des macrophages. L'infection dépend d'une phagocytose rapide des promastigotes et de leur transformation en amastigotes qui, dans une vacuole parasitophore, résistent aux mécanismes de décence cellulaire. Le parasite entraîne dans le macrophage une baisse des capacités de production des dérivés oxygénés et nitrogénés, complétant ainsi les mécanismes d'échappement des leishmanies à la digestion cellulaire. Les phénomènes de coopération cellulaire entre les macrophages et les lymphocytes (CD4+ et CD8+) jouent un rôle important dans l'évolution de la maladie. Dans un nombre de cas, l'infection reste asymptomatique mais des amastigotes intracellulaires peuvent rester quiescents des années, expliquant les leishmanioses opportunistes de l'immunodéprimé. Lorsque la multiplication intracellulaire reste localisée aux macrophages et aux cellules dendritiques du site d'inoculation, les réactions cellulaires générées et les diverses cytokines produites entraînent le développement d'une lésion cutanée localisée. Les parasites peuvent également être transportés aux ganglions lymphatiques, diffusant à d'autres sites cutanés comme dans la leishmaniose cutanée diffuse (LCD), ou aux muqueuses comme dans la leishmaniose cutanée muqueuse (LCM). Dans d'autres cas, les parasites s'étendent à tous les organes du système des phagocytes mononucléés, provoquant la LV. Dans cette forme, les organes les plus couramment atteints sont la rate (splénomégalie), le foie, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse.

### **3.6-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, de l'homme. Le développement de cet

effet immunomodulateur a ainsi des conséquences sur la transmission des pathogènes et le développement des pathologies associées [4]. 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), des lymphocytes B (LB) et le complément (voie classique et voie alternative). La durée du contact homme-vecteur ainsi que la manière de prélever le sang (telmophagie/solénophagie) influence les effets immunomodulateurs induits par la salive des vecteurs. En plus de cette influence immunomodulatrice sur l'immunité innée et adaptative, certaines protéines salivaires ont des propriétés immunogéniques qui induisent la production d'anticorps (Ac) dirigés spécifiquement contre ces protéines (IgM, IgE et IgG) [5, 6]. 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 [15].

L'étude des protéines salivaires et de leurs effets immunomodulateurs sur la réponse immunitaire de l'homme représente une voie de recherche qui permet de mieux caractériser les mécanismes de transmission des pathogènes et la relation homme-vecteur dans l'optique d'un contrôle plus efficace des maladies à transmission vectorielle. A ce titre, l'étude des réponses Ac spécifiques aux protéines salivaires est une voie de développement de nouvelles stratégies vaccinales contre la transmission des pathogènes du vecteur à l'homme. Les données les plus récentes 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 le modèle animal expérimental [8]. Ce modèle expérimental murin a été largement étudié car la pathologie induite est cutanée, facilement quantifiable et la réponse immune associée semble clairement définie.

### **3.6.1-Quelques rôles pharmacologiques des protéines salivaires des phlébotomes**

#### **3.6.1.1-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. La lésion de l'endothélium par les pièces buccales entraîne une libération d'Adénosine Di Phosphate (ADP) 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 s'adhérant entre elles et au sous endothélium, et s'activent. 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.

L'apyrase est la protéine la plus communément retrouvée chez les espèces hématophages. Elle a été décrite chez de nombreuses espèces d'arthropodes. Elle hydrolyse l'ADP et l'ATP en AMP (Adenosine monohosphate) 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 [28]. Cette protéine est retrouvée chez de nombreux d'insectes hématophages dont les simulies [29], *Lutzomyia longipalpalis* [30], les moustiques [31, 32], *Rhodnius* [33] et *Glossina morsitans* [34]. Elles diffèrent suivant les espèces par leur pH optimal d'action et de la nature des cations divalents requis pour leur activation ( $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ ) [35]. Un autre type d'apyrase, n'appartenant pas à la famille des 5' nucléotidase, a été identifié chez *Cimex lectularius* [36]. Elle présente des similitudes avec celle des phlébotomes et des humains. L'apyrase a une grande importance dans le comportement alimentaire des moustiques [37, 38].

### **3.6.1.2-Inhibition de la coagulation**

Les insectes hématophages ont des stratégies leur permettant de contourner le processus de coagulation. Certains produisent des facteurs anticoagulants, 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 vecteur prenne son repas sanguin [39].

### **3.6.1.3-Vasodilatation**

L'injection de vasodilatateur au site de piqûre permet d'augmenter le flux sanguin et de contrer l'effet des vasoconstricteurs endogènes (TXA2 et sérotonine), réduisant ainsi le temps de contact entre le vecteur et l'homme. Certains arthropodes utilisent des peptides ou des petites protéines qui interagissent avec les récepteurs endogènes des vertébrés.

Le maxidilian (MAX), découvert chez *Lutzomyia longipalpalis* [40], est un vasodilatateur à action persistante qui présente également des propriétés immunogéniques impliquées dans l'exacerbation de la pathologie de la leishmaniose [41]. Les phlébotomes de l'ancien monde (*Phlebotomus papatasi*) ne possèdent pas la protéine maxidilan mais accumulent dans leur salive des amines (adénosine et AMP) vasodilatatrices [40].

### **3.6.1.4-Inhibition de la réaction inflammatoire**

La destruction des tissus par les pièces buccales des insectes entraîne également une réaction inflammatoire chez de l'homme qui se caractérise par la triple réponse de Lewis : douleur, chaleur, rougeur. Les deux derniers signes cités résultent d'une vasodilatation locale. Le complexe prékallikréine -HK et le collagène libéré par les cellules lésées vont activer la voie endogène ou système contact 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 [42]. L'ATP libéré par

les cellules lésées active les polynucléaires neutrophiles qui s'accumulent et dégranulent au niveau du site de blessure [43]. Ils libèrent des cytokines (IL-1, IL-6 et TNF $\alpha$ ) responsables de l'augmentation de la douleur [44]. La sérotonine et l'histamine libérées par les plaquettes et les mastocytes sont également impliquées dans l'exacerbation de la douleur et dans l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux. De nombreuses molécules interagissent pour générer la douleur qui accompagne l'inflammation [45]. Les insectes possèdent au sein de leur salive des composés capables d'inhiber chez l'hôte la sensation de douleur provoquée par leur piqûre.

De nombreux insectes hématophages possèdent des protéines salivaires appartenant à la famille des protéines D7 [39, 46, 47]. La fonction de ces protéines reste incertaine, mais deux 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 [39, 46] [48], ii) elles seraient capables de capter des médiateurs de la réponse hémostatique de l'homme tels que la sérotonine, l'histamine, la norépinephrine [46, 49]. Ces protéines chez *Culex sp.* [49] ont montré des propriétés immunogéniques.

### **3.6.2-Immunomodulation par la salive: de la réponse immune innée à la réponse adaptative**

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 [50]. 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 [41, 51]. 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 [8]. Ainsi, la salive des phlébotomes *Lutzomia* et *Phlebotomus* module la réponse immune innée et adaptative de l'hôte. Dans d'autres 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 [17].

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 notamment l'interleukine (IL) 12 et l'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) [52]. 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 démontré que ce 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 [18]. L'administration locale de MAX induit des érythèmes cutanés et inhibe l'activation des LT [53]. La cible préférentielle du MAX est le macrophage, cellule hôte des leishmanies [29, 54]. Il peut inhiber la production de substances ayant une action antiparasitaire telles que le NO, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le facteur nécrosant des tissus par les macrophages [55, 56].

Les mécanismes immunologiques semblent néanmoins être dépendants du complexe pathogène étudié. En effet, la salive de *P. papatasi* présente des effets immunomodulateurs similaires à ceux de *L. longipalpis*. A la différence la salive de *P. papatasi* augmente le taux d'IL-4, de cytokine de type Th2 et n'a pas d'effet sur la production de TNF $\alpha$ . 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 [57]. La salive des moustiques a également une influence sur le développement de la pathologie. En effet la co-injection de *Plasmodium berghei* avec de salive de moustiques exacerbe la pathologie et facilite la transmission [58]. 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 (réponse immune à médiation cellulaire et humorale) de l'hôte [35]. La salive des simulies 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 complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II [29].

### **3.6.3-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 $\gamma$  et semble protéger contre l'infection [14, 15, 51, 58]. 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 coinjection 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* [51]. A l'inverse, une étude récente a démontré que la pré-exposition de souris à la piqûre d'*Aedes* non infectés

exacerberait 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 [59]. 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 [14]. Cela signifie que la pré-exposition aux antigènes salivaires induirait un microenvironnement particulier qui serait favorable ou non à la transmission des pathogènes par un effet immunomodulateur au site de piqûre.

### **3.7-Diagnostic de la leishmaniose cutanée**

#### **3.7.1-Diagnostic d'orientation ou clinique**

Repose essentiellement sur la notion d'un séjour en pays d'endémie et sur l'évolution chronique d'une ou plusieurs lésion (s) ulcérée (s). La clinique commence par l'apparition d'une papule rouge indolore sur la peau au niveau des zones découvertes (visage, cou, bras et jambes) qui sont les plus courantes. La papule s'indure puis s'ulcère en se recouvrant d'une croûte. Le diagnostic ne pourra être confirmé que par le laboratoire [9, 55].

#### **3.7.2-Diagnostic biologique**

##### **3.7.2.1 Mise en évidence du parasite:**

##### **3.7.2.2 L'examen direct après coloration :**

Il se fait sur les frottis de grattage de la lésion en bordure, de la face interne de l'ulcération sur sa périphérie jusqu'à ce qu'il soit légèrement teinté de sang, les prélèvements par ponction du nodule à la seringue, sur des coupes histologiques.

Les frottis seront colorés par Giemsa après fixation par May Grünwald puis examinés à l'immersion à l'objectif 100.

Les corps de leishmanies se trouvent groupés à l'intérieur des macrophages ou en apparence libre. Ce sont des capsules ovoïdes de deux à six microns de diamètre, son cytoplasme est bleu, il contient un noyau teinté en rouge violacé et pourvu d'un gros caryosome central, à côté du noyau. On

distingue un appareil flagellaire rudimentaire composé d'un blépharoplaste rhizoplaste.

### **3.7.2.3-Culture :**

Les formes promastigotes sont révélées par la culture sur milieux spéciaux enrichis en sérum ou en sang (NNN «Novy, Mac- Neal, Nicolle», RPMI «Roswell Park Memorial Institute»). L'identification des espèces réalisable à partir de ces cultures n'est possible que dans de rares laboratoires spécialisés.

Actuellement, l'adjonction de 1250UI de pénicilline par millilitre (ml) permet d'obtenir des cultures presque pures sans repiquage, tout en maintenant celles-ci à la température optimale de 22°C. Les cultures sur l'embryon de poulet, ou plus simplement sur le blanc d'œuf non embryonné recueilli aseptiquement et maintenu à 25°C, donneront des résultats au moins aussi satisfaisants: colonies qui, vers le 10ème jour, confluent en un voile blanchâtre.

### **3.7.2.4-PCR**

Les méthodes basées sur la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont maintenant disponibles pour le diagnostic et/ou l'identification des *Leishmania* à partir d'échantillons humain et canin. Essentiellement, les techniques développées soit pour détecter les organismes, frais ou congelés, à partir de biopsies, soit pour identifier des isolats établis de *Leishmania* comprend: (a) la digestion du matériel avec de la protéine K et l'extraction de l'ADN; (b) l'amplification de la PCR standard utilisant des séquences d'oligonucléotides sélectionnées à partir de petites sous-unités du gène ARNr comme amorces, des minicercles d'ADN de kinétoplaste ou d'autres séquences d'ADN génomique hautement répétitives; (c) l'analyse des produits d'amplification par gel d'agarose à 1-2 %.

### **3.7.2.5-Sérologie**

Plusieurs épreuves sérologiques sont maintenant utilisées pour détecter les anticorps anti-leishmania (2, 12, 13, 29). Cependant, elles sont appliquées seulement aux individus qui ne sont pas immunodéprimés. Un pourcentage élevé de patients atteints de leishmaniose et co-infectés avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), s'est révélé séronégatif pour les anticorps anti-leishmania (9).

### **3.7.2.6-Diagnostic immunologique**

Les techniques immunologiques les plus utilisées sont l'ELISA, immunofluorescence indirecte (IFI) et l'hémagglutination indirecte. L'immuno-empreinte (Western-Blot) est la technique la plus sensible pour le suivi des malades.

### **3.7.2.7-Intradermoréaction à la leishmanine ou réaction de Monténégro (LST)**

L'hypersensibilité retardée est une caractéristique importante de toutes les leishmanioses humaines et peut être mesurée par le test à la leishmanine, également connue sous le nom de test de Monténégro [60].

La positivité au test de Monténégro est observée chez les sujets ayant eu un contact antérieur avec le parasite qu'ils aient ou non manifesté la maladie (formes asymptomatiques). Le test reste positif toute la vie du patient même après la guérison. Il reste un bon moyen de surveillance en épidémiologie.

La leishmanine est une suspension de promastigotes entiers tuée ( $0.5-1 \times 10^7/\text{ml}$ ) dans une solution saline sans pyrogène et contenant du phénol. L'espèce de leishmanie utilisée n'a pas d'importance [27].

La dose individuelle est de 0,1 ml, c'est-à-dire 100.000 parasites. Une injection de 0,1 ml de solution de phénol sans parasites est faite à proximité, comme témoin d'une éventuelle sensibilité du patient au phénol [7]. Une réaction retardée se développe et est lue 48 à 72 heures plus tard.

La réaction positive donne un nodule induré entouré d'érythème. Les indurations de diamètre supérieur ou égal à 5mm sont considérées comme positives.

Le test cutané à la leishmanine ne peut différencier la LC de la LV dans une même localité [61].

### **3.8-Traitement des leishmanioses**

Il consiste à faire un traitement local si la lésion est unique et traitement général si les lésions sont multiples ou diffuses.

#### **3.8.1-Médicaments**

##### **3.8.1.1-Sels d'antimoine pentavalents (SbV)**

A l'usage parentéral IM ou IV

→ **Teneur en antimoine distincte:** antimoniate de N-méthyl glucamine ou GLUCANTIME®: 85mg/ml, stibiogluconate de sodium ou PENTOSTAM®: 100mg/ml

→ **Effets secondaires de l'antimoine:**

Stibio-intolérance de type anaphylactique: frissons, fièvre, arthromyalgies, éruption cutanée, toux coqueluchoïde, tachycardie, lipothymie, hémorragies.

Stibio-intoxication par surdosage en fin de cure: fièvre, myalgies, arthralgies, névralgies, avec troubles de la conduction cardiaque, cytolysse hépatique et pancréatique, atteinte hématologique, insuffisance rénale aiguë, accident le plus redoutable.

##### **3.8.1.2-Sels de pentamidine:**

**Isethionate de pentamidine** (ENTACARINAT®, Pentacarinat®)

Réactions immédiates de type allergique

Effets toxiques dépendants des doses cumulées: atteinte rénale, pancréatique (diabète induit) ou hématologique, rhabdomyolyse

### **3.8.1.3-Amphotéricine B et ses formulations lipidiques:**

Amphotéricine B (FUNGIZONE®), tolérance immédiate médiocre : frissons, fièvre et toxicité rénale.

AmBisome®: le facteur limitatif à son emploi est son prix très élevé.

### **3.8.1.4-Miltéfosine: (IMPAVIDO®)**

Ce médicament na été évalué que contre *L. donovani*. Il se présente sous forme de capsules de 10 mg et de 50 mg

**Effets secondaires:** vomissements, diarrhée dans 50% des cas, tératogénicité

### **3.8.1.5-Autres traitements**

Antifongiques par voie orale : kétoconazole, itraconazole, fluconazole,  
Paramomycine (aminoglycoside) par voie orale ou locale,

## **3.8.2-Indications**

### **3.8.2.1-Leishmaniose cutanée**

Injections d'antimonioux intra-lésionnelles ou par voie parentérale dans les LC de l'Ancien Monde,

→ injections parentérales d'antimoine ou de sels de pentamidine dans les LC du Nouveau Monde,

→ autres traitements: antifongiques oraux si LC à *L. tropica* ou paramomycine locale si LC à *L. major*.

### **En pratique:**

→ LC à *L. major*: aucun traitement ou traitement local par paramomycine

→ LC à *L. tropica*: traitement par fluconazole oral pendant 6 semaines

→ LC à *L. guyanensis*: traitement par pentamidine IM, 2 injections de 4 mg/kg de pentamidine-base (7 mg de PENTACARINAT®) espacées de 2 jours.

### **3.8.3-Moyens**

En raison de la toxicité ces traitement peu onéreux par lui-même, un suivi médical en milieu hospitalier est nécessaire et peut coûter cher.

### **3.8.4-Thermothérapie**

Elle se fait à l'aide du Thermo Med Model 1.8, une machine électrique fabriquée aux Etats-Unis et ayant fait sa preuve dans le traitement de la leishmaniose cutanée à Kabul en Afghanistan. Après une anesthésie locale avec de la xylocaïne à 2%, la thérapie se fait par hyperthermie induite localisée. Elle se fait à 50°C maintenue pendant 30 secondes. Elle permet de détruire ou d'affaiblir les parasites tout en limitant les effets sur les cellules saines.

### **3.9-Propylaxie des réservoirs et des vecteurs**

Les mesures de prévention ayant pour but la diminution de la propagation de la maladie doivent être basées sur le contrôle de la transmission zoonotique et de la transmission anthroponotique.

Dans la transmission zoonotique, il est conseillé d'éviter le contact avec le vecteur. Ce dernier est actif après le coucher du soleil et pendant la nuit dans les régions chaudes. De plus, il faut mettre en place des techniques de prophylaxie, telles que l'application d'insecticides péri ou intra domiciliaires et l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide [24]. Les études sur la protection des chiens par l'imprégnation des colliers avec de la deltaméthrine ont démontré une efficacité prometteuse [24, 41, 62]. L'amélioration des systèmes de diagnostic, de surveillance et de traitement des chiens malades semble être nécessaire.

Dans la transmission anthroponotique, il est conseillé d'améliorer les systèmes de surveillance, de diagnostic précoce et le suivi des cas de résistance. Cela est fait dans le but d'éviter la propagation de la maladie surtout vers les régions non endémiques [24].

### **3.9.1-Prophylaxie individuelle**

Il faut éviter la piqûre des phlébotomes par l'utilisation des répulsifs, l'utilisation des moustiquaires imprégnées à maille serrées, le port de vêtement recouvrant le maximum de surface corporelle et ne pas se promener à la tombée du jour en bordure de bois et de fourres.

### **3.10-Approche vaccinale**

La mise au point de vaccins contre les maladies transmises par des vecteurs est délicate car ces maladies font intervenir le trio: l'hôte humain, le vecteur et le parasite. Cela est particulièrement vrai pour les maladies parasitaires pour lesquelles aucun vaccin n'est actuellement disponible. Cela est probablement dû à la complexité du parasite durant son cycle chez l'homme.

Une forte réponse cellulaire anti-salive pourrait inhiber le bon déroulement de la piqûre en inhibant l'effet anti-inflammatoire de certaines protéines salivaires et/ou en facilitant la production de cytokines localement au site de la piqûre [28, 52].

Le second mécanisme de protection qui pourrait agir de concert avec le premier serait indirect, puisque visant le parasite transmis. En effet, la réponse immune anti-salive induite après l'immunisation par des protéines salivaires pourrait entraîner la mise en place d'un microenvironnement défavorable au développement du parasite au niveau du site de la piqûre [16]. La réponse immune anti-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 *Lutzomyia longipalpalis*). Dans le modèle expérimental, l'injection d'extraits de glandes salivaires de phlébotomes avec *L. major* semble exacerber la pathologie. Cet effet peut être complètement annihilé par la pré-exposition de l'hôte aux extraits de glandes salivaires du vecteur [14]. Ce même phénomène protecteur peut être également retrouvé après une pré-exposition aux piqûres non infectantes [15]. La pré-exposition " salivaire " induit une réponse immune protectrice locale et permet une réduction des lésions et une diminution de la charge parasitaire au site de la piqûre. Ces mêmes auteurs ont également démontré que cette réponse protectrice pouvait être reproduite par l'injection d'une protéine de 15kDa de la salive de phlébotome (Psp15), suggérant aussi que cette protéine pourrait être un candidat vaccinal anti-transmission [16].

L'avantage premier d'utiliser une protéine salivaire comme cible vaccinale anti-transmission est que les populations vivantes en zone de transmission sont exposées aux piqûres des vecteurs (non infectante, le plus souvent) pendant toute la 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.

## 4-MEHODOLOGIE

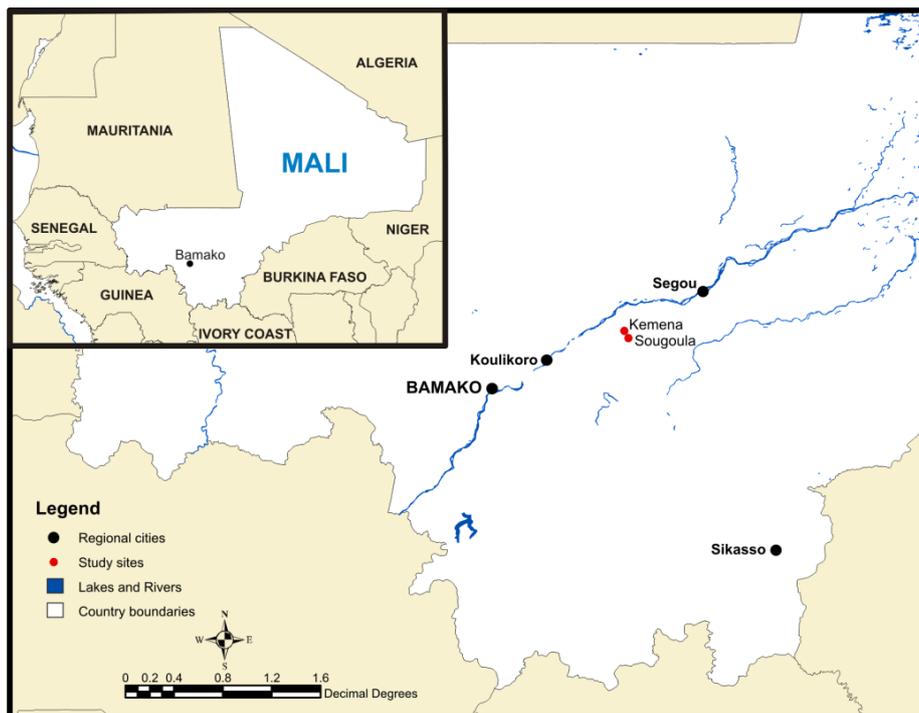
### 4.1-Cadre d'étude

L'étude a eu lieu dans les villages de Kéména et Sougoula dans la commune rurale de Barouéli (région de Ségou), situés à environ 180 km par route au Nord-est de Bamako (Figure 5).

Les villages de Sougoula et de Kéména sont respectivement situés à 10km et à 5km au Nord-Ouest de Barouéli au 13°7'30.50"N et 6°54'46.30W, et au 13°5'24.97"N, 6°53'11.86"W.

Ces deux villages ont été choisis sur la base des cas de L.C diagnostiqués lors d'une visite de prospection effectuée par l'équipe de recherche du MRTC/CNAM/NIH dans la zone en 2004. D'autres facteurs comme la bonne coopération des habitants, l'accessibilité de la zone en toute saison, la présence des phlébotomes ont aussi contribué au choix de ces sites [10].

C'est à partir de ce constat qu'un programme de surveillance active de la leishmaniose a été initié pour déterminer le vecteur incriminé, la prévalence et l'incidence de l'infection à *Leishmania major* ainsi que le niveau de exposition aux piqûres de *P. duboscqi* [13].



**Figure 5:** Localisation de la commune de Barouéli et les villages d'étude sur la carte du Mali (Source: MRTC-DEAP-FMPOS, Section GIS).

#### 4.2-Historique des sites d'étude

Le village de Kéména a été créé il y a environ 370 ans par un Peulh du nom de Djimé SANGARE originaire du Ouassoulou à la quête de pâturage pour son bétail. Il s'installa définitivement dans cette zone fertile pour pratiquer l'agriculture et l'élevage. Plus tard d'autres personnes (Frères, cousin et autres) sont venues se joindre à lui à cause de la bonne récolte et du pâturage. Les Sarakolés de Djimikoro, l'actuel Banamba (Kouma, Sylla) sont venus à Kéména pour faire le petit commerce d'échange et se sont définitivement installés dans le temps en faisant l'agriculture sur place et le commerce des produits vivriers et d'élevage.

La chefferie est assurée par le plus âgé des Sangaré du village, en respect avec les coutumes et les traditions léguées par les ancêtres.

*Sory Sangaré* est l'actuel chef de village. La religion musulmane est dominante et le village possède une école coranique (Medersa), une école

primaire de trois salles pour quatre classes. La population est estimée à environ 1000 habitants en 2006.

Trois frères DIARRA ont quitté le royaume Bambara de Ségou à la suite des guerres intestines pour fonder le village de Sougoula vers le XVI<sup>e</sup> siècle. Chaque frère fonda sa famille en donnant des noms particuliers comme Bogobala, Niankorola et Sadiala.

La chefferie du village est assurée par l'un des descendants de ces trois familles par droit de naissance. L'actuel chef de village, Fassoun Diarra, fait parti de la famille de Bogobala et serait le 56<sup>ème</sup> chef. A coté des Diarra, sont venus s'ajouter les Traoré et les Sarakolés. Sougoula est le chef tributaire des villages de Kéména, Dioni et Mentola.

Le village possède une école primaire semi-communautaire de trois salles pour six classes. Elle relève de l'académie d'enseignement de la commune de Barouéli. En 2006, la population était estimée à 1200 habitants. La religion musulmane est dominante.

#### **4.2.1-Relief:**

Le relief est constitué par de vastes plaines sèches et de petites collines isolées visibles au nord et à l'ouest des deux villages. Le sol est de type sablo-argileux.

#### **4.2.2-Climat:**

Le climat est du type soudano-sahélien avec deux grandes saisons:

- une courte saison des pluies de 4 mois (juin à septembre) durant laquelle les précipitations sont abondantes et atteignent leur maximum en août (960mm par an).
- une longue saison sèche couvrant le reste de l'année (octobre à mai) et se divise en saison sèche froide (octobre à février) et en saison sèche chaude (mars à mai).

La température moyenne mensuelle minima est 25<sup>0</sup>C et la moyenne des maxima est 33,5<sup>0</sup> C. Les vents dominants sont l'harmattan (septembre à mai) et la mousson (juin à octobre).

### 4.2.3-Végétation:

La végétation dans les deux zones se compose comme suit:

- d'une savane arbres du type soudanien dont les éléments caractéristiques sont le Karité (*Vitellaria paradoxa*), le Baobab (*Adansonia digitata*), le Balazan (*Acacia albida*), le Caïcédtrat (*Kaya senegalensis*), etc. On y rencontre également une sous-strate ligneuse à base de Combrétacées.
- d'une savane arborée qui doit son existence à la nature favorable du sol.
- d'une savane herbeuse qui occupe en grande partie le lit des points d'eau. Dans cette formation herbeuse, on rencontre çà et là disséminées certaines graminées et cypéracées. Cette végétation est souvent utilisée par les populations pour les besoins de médecine traditionnelle.

### 4.2.4 La faune:

La faune entomologique comporte certains insectes d'importances médicales parmi lesquels on peut citer:

→ La famille des *Psychodidae*

Dans la sous famille des *Phlebotominae*, on trouve 2 espèces du genre *Phlebotomus* [10] : *P. duboscqi* responsable de la transmission du parasite de la leishmaniose cutanée au Mali [11] et *P. rodhaini*.

Plusieurs espèces du genre *Sergentomyia* sont connues dans ces deux localités : *S. clydei*, *S. africana*, *S. bedfordi*, *S. schwetzi*, *S. antennata*, *S. fallax*, *S. buxtoni*, *S. squamipleuris*, *S. affinis vorax*, *S. dubia* et *S. darlingi* [10].

→ La famille des *Culicidae*:

Les moustiques femelles sont d'une importance considérable en médecine en raison de leur rôle dans la transmission des maladies qui comptent parmi les problèmes majeurs de Santé Publique: paludisme, arboviroses (fièvre jaune, dengue, encéphalite japonaise...), filarioses lymphatiques.

Les anophèles femelles sont les vecteurs du plasmodium, l'espèce responsable de la transmission du parasite à l'homme dans cette zone appartient au complexe *An. gambiae sl.*

Dans la sous famille des *Culicinae* on rencontre le genre *Culex spp.*

#### **4.3-Population d'étude**

Au terme d'une enquête démographique effectuée par le *Malaria Research and Training Center* (MRTC) en 2006, la population totale de Sougoula et de Kéména s'élevait à 1700. Cette population était constituée majoritairement de Bambara, de Peulh et de Sarakolé.

La population de notre étude était constituée des sujets résidents permanents volontaires de Kéména et de Sougoula répondant aux critères d'inclusions ci-dessous.

#### **4.4-Type et période d'étude**

Il s'agissait d'une étude transversale à deux passages.

Le premier passage a eu lieu au mois de mars 2009 au cours duquel on a procédé à la collecte d'échantillons de sang.

Le second passage a eu lieu au moi de juin 2009 pendant lequel, les arthropodes hématophages on été identifier dans les deux villages.

#### **4.5-Echantillonnage**

Il consistait à recruter dans la population d'étude les individus composant l'échantillon suivant les critères fixés à priori.

La taille de notre échantillon a été 117 sujets composés des adultes âgés de et des enfants.

**4.5.1-Critères d'inclusion**

Touts les sujets devraient être âgés au moins deux (2) ans.

Ils ne devraient pas présenter une maladie chronique comme asthme ou tuberculose.

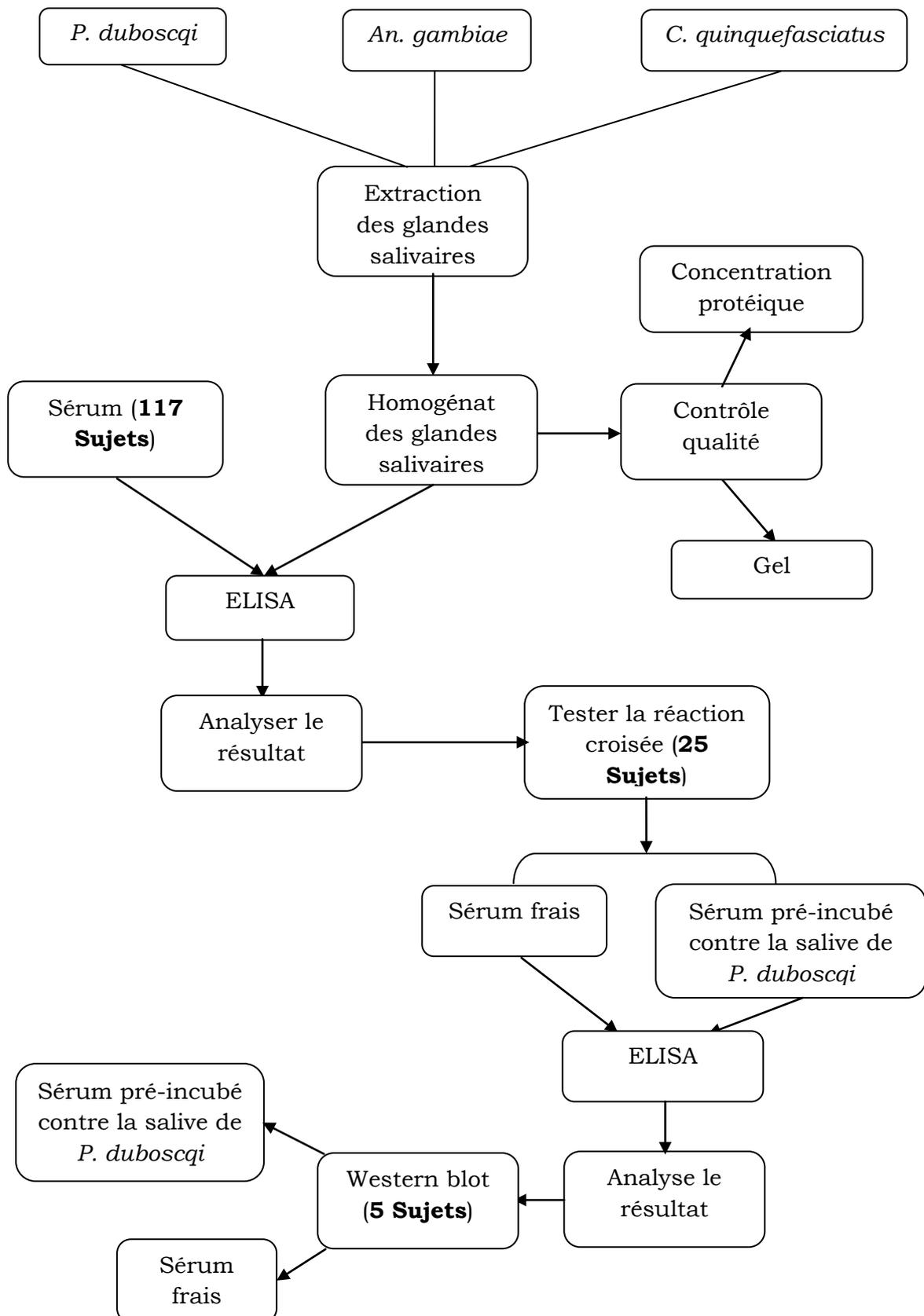
Il valait être un résidant de Kéména ou de Sougoula.

Les adultes ont donné un consentement éclairé et un assentiment pour les enfants.

**4.5.2-Critères de non inclusion**

Les sujets ne répondant pas aux critères d'inclusion précédemment fixé, n'étaient pas retenus dans l'étude.

#### 4.6-Collecte des données



**Figure 6:** Diagramme de traitement des échantillons

#### **4.6.1-Prélèvement de sang**

Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur les sujets inclus dans l'étude par ponction veineuse. Le sang total était conservé sur un anticoagulant (héparine) et transporté au laboratoire à Bamako. Après centrifugation, le plasma a été séparé des globules blancs. Il était gardé dans un congélateur à -20°C avant son utilisation et les globules blancs étaient pour une autre étude.

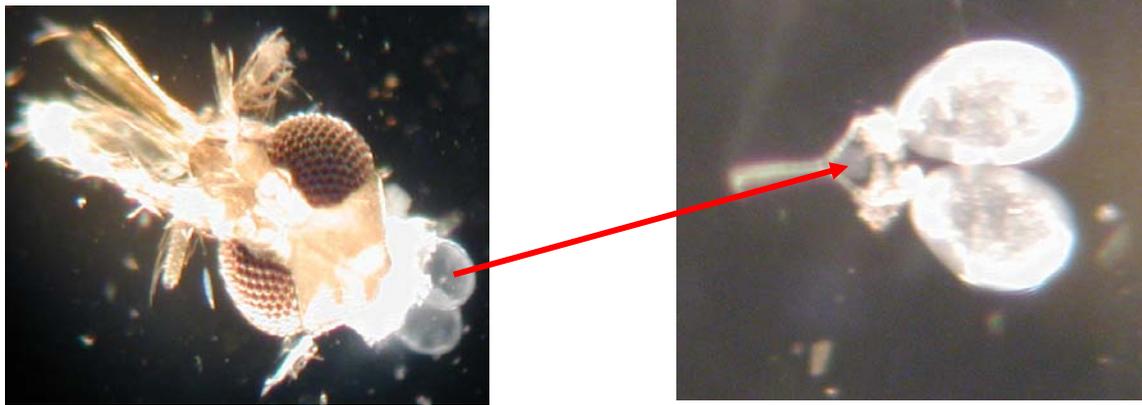
#### **4.6.2-Identification des arthropodes hématophages**

Le village a été réparti en blocs composés chacun de plusieurs concessions. Parmi lesquelles deux concessions ont été choisies dans chaque bloc. C'est ainsi que le spray catch était fait dans deux chambres de chaque concession retenue par bloc.

#### **4.6.3-Extraction de la glande salivaire des arthropodes hématophages.**

La salive des trois arthropodes hématophages majoritaires présents dans la zone a été analysée (*P. duboscqi*, *An. gambiae* et *Culex sp*). Les extraits salivaires totaux ont été collectés à partir des arthropodes hématophages femelles non infectées qui sont élevées dans le laboratoire des instituts nationaux de santé des Etats-Unis (NIH; *Twinbrook III, MD, USA*). Puis que l'espèce de *Culex* n'était déterminée, le *Culex quinquefasciatus* a été utilisé.

Les femelles étaient lavées avec de l'eau savonneuse à 5% puis transférées dans de PBS (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 10mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40mM, NaCl 120mM, pH7.4). Elles étaient ensuite disséquées à l'aide d'une pince sur une lame (Cytoslide™) sous la loupe. La tête était légèrement séparée du thorax et la paire de glandes salivaires apparaissait sous formes de boules claires et brillantes. Elles étaient récupérées délicatement à l'aide d'une seringue pour les placer dans un tube Eppendorf® de 1.5 ml contenant 20µl de PBS. Vingt paires de glandes salivaires étaient placées dans un tube.

**A****B**

**Figure 7: Paire de glandes salivaires de *P. duboscqi* adulte femelle.**

**A**=paire de glandes salivaires et la tête du *P.duboscqi*

**B**=paire de glande salivaire détachée de la tête du *P.duboscqi*



**Figure 8:** Image de glandes salivaires d'*An. gambiae sl* adulte femelle

#### **4.6.4-Obtention de l'homogénat de la glande salivaire**

Les glandes salivaires ont été broyées à l'aide d'un homogénéisateur pour tube Eppendorf® (Ultrasonication). Ce broyat a été centrifugé à 14000 rpm pendant 3 min. Ensuite le surnageant des glandes salivaires extraites était conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant l'utilisation.

#### **4.6.5-Contrôle de qualité des pools salivaires**

##### **4.6.5.1-Dosage des protéines totales**

La technique utilisée colorimétrique quantitative basée sur le test de l'acide bicinchoninique a été utilisée pour déterminer la concentration protéique des pools salivaires (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce). La concentration était déterminée en comparant la DO (densité optique) de la gamme de dilution de l'échantillon standards à la DO des pools à doser grâce à une régression linéaire. Chaque pool était testé en duplicata. Le protocole a été réalisé selon les recommandations du fabricant ([www.thermo.com/pierce](http://www.thermo.com/pierce)) **annexe 9.1**.

#### **4.6.5.2-Electrophorèse sur gel**

L'équivalent de 5 paires de glandes salivaires de chaque pool a été migré sur le gel polyacrylamide. Les différentes protéines salivaires se sont séparé les unes des autres selon leurs tailles et leurs poids sur le gel. Un couloir était réservé au marqueur ou "échelle standard" qui est une mixture de protéines possédant des poids moléculaires définis et disponibles dans le commerce (SeeBlue®Plus2).

La révélation de l'ensemble des protéines a été faite par une technique de coloration au nitrate d'argent (*Silver Staining Kit*). Le protocole a été réalisé selon les recommandations du fabricant ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)) **annexe 9.2**

#### **4.6.6-Dosage du taux d'anticorps anti-salive de *P. duboscqi* par ELISA**

##### **4.6.6.1-Principe du test**

Le test immuno-enzymatique (ELISA) utilisé était celle de sandwich. Les puits de la plate étaient sensibilisés avec 2 paires/ml des extraits totaux des glandes salivaires. Les anticorps spécifiques, contenus dans les échantillons (Sérum) se lient à l'antigène fixés aux puits. Ils ont été détectés par un second anticorps conjugué à une enzyme et spécifique aux IgG humaines (Sigma, MO). Suite à la réaction de substrat, l'intensité de la couleur développée était proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques IgG. Le dosage était réalisé en triplicata pour chaque sujet et la moyenne des trois valeurs était retenue.  $DO = [(DO1 + DO2 + DO3) / 3]$  **annexe 9.3**.

#### **4.6.7-Détermination de la spécificité du taux d'anticorps anti-salive *P. duboscqi***

Pour savoir que le taux d'IgG anti-salivaire était bien spécifique des protéines salivaires de *P. duboscqi*, les extraits totaux de la salive de *P. duboscqi* a été utilisé contre celui des deux autres vecteurs arthropodes présents dans ces deux villages.

##### **4.6.7.1-Analyse de réaction croisée par la technique d'ELISA**

Les 25 échantillons qui présentaient le taux d'anticorps anti-salive les plus élevé pour chaque arthropode étaient choisis pour tester la possibilité de réaction immunologique croisée.

Le principe du test était de pré-incuber le sérum contre les extraits totaux de la salive de *P. duboscqi*. Enfin de savoir si l'anticorps anti-salivaire d'*An. gambiae* *sl* ou de celui de *C. quinquefasciatus* réagissait avec l'antigène *P. duboscqi* lorsqu'on le compare au sérum frais (sérum non pré-incubé) d'un même individu par ELISA.

##### **4.6.7.1.1-Mode opératoire**

Les plaques ont été sensibilisées avec les extraits totaux de la glande salivaire d'*An. gambiae* *sl* ou *Culex quinquefasciatus*. Le sérum pré-incubé et le sérum frais du même individu ont été incubés pendant une heure à 37°C. Les anticorps spécifiques contenus dans l'échantillon se lient à l'antigène fixés aux puits. La réaction antigène-anticorps est détectée par un second anticorps conjugué à une enzyme et spécifique aux IgG humaines (Sigma, MO). Suite à la réaction de substrat, l'intensité de la couleur développée était proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques IgG. Cette coloration visible à l'œil nu, peut être quantifiée grâce au spectrophotomètre. Chaque échantillon était réalisé en triplicata. La moyenne de la densité optique était calculée  $DO = [(DO1 + DO2 + DO3)/ 3]$  [annexe 9.4.](#)

#### **4.6.7.2-Analyse de réaction croisée par la technique de Western blot**

C'est une technique de biologie moléculaire qui utilise l'électrophorèse sur gel polyacrylamide pour séparer des antigènes, préalablement dénaturés, selon leur masse. Il est possible grâce à cette technique de détecter le complexe antigène-anticorps, d'évaluer sa taille, l'intensité des bandes et les variations des bandes effectuées.

Le but du test était de voir s'il y avait une réaction croisée entre les protéines salivaires de *P. duboscqi* et celle des deux autres vecteurs. Pour cela, cinq échantillons de chaque arthropode qui présentaient une grande différence de taux d'anticorps anti-salive du sérum pré-incubé et du sérum frais après ELISA ont été choisis pour le tester.

##### **4.6.7.2.1-Migration des protéines salivaires**

Une électrophorèse sur gel a été réalisée tout d'abord (NuPage 4-12% Bis Tris Gel 1.0 mm x 10 well, Invitrogen, Carlsbad, CA) qui, à partir d'un seul puits, permet de faire migrer les protéines dans deux dimensions. L'équivalent de 20 paires de glandes salivaires de chaque échantillon a été migré sur différents gels. Un couloir était réservé au marqueur ou "échelle standard" qui est une mixture de protéines possédant des poids moléculaires définis et disponibles dans le commerce (SeeBlue®Plus). Le tampon d'électrophorèse (*Running buffer*) était du tampon TGS (Tris-glycine-LDS) concentré 1x dans de l'eau distillée. Une tension de 180mA était appliquée pendant 1h30 min.

##### **4.6.7.2.2-Transfert des protéines sur la membrane**

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles ont été transférées des gels à des membranes de nitrocellulose. Le kit utilisé était: <<*iBlot™ Gel Transfer Stacks Kit*>>.

##### **4.6.7.2.3-Blocage**

Les sites d'interactions non spécifiques des membranes ont été bloqués en plongeant la membrane dans une solution diluée de lait à 5% avec TBS (5g

de lait pour 100 ml TBS). Cette étape s'est déroulée sous agitation continue pendant une nuit à 4°C.

#### **4.6.7.2.4-Anticorps primaire**

Le sérum pré-incubé et le sérum frais constituaient l'anticorps primaire. La dilution du sérum était de 1:50 dans de TBS/BAS à 4%. Pour chaque échantillon, 150µl de sérum dilué a été logé plus 150 µl de TBS/lait à 5% pour permettre à l'échantillon de bien couvrir la membrane à nitrocellulose. La manipulation s'est passée à la température ambiante sous agitation continue pendant 1h30mn.

#### **4.6.7.2.5-Anticorps secondaire**

Après rinçage, afin d'enlever les anticorps primaires non liés sur les membranes, celles-ci ont été exposées à un second anticorps (anticorps chèvre anti IgG humains) dilué au 1/1000 avec TBS/BSA 4% couplés à une phosphatase alcaline PA (Sigma, MO). La manipulation était à température ambiante sous l'agitation continue pendant 1h.

#### **4.6.7.2.6-Révélation des protéines salivaires**

Après le rinçage des seconds anticorps non-liés, les membranes ont été incubées avec la solution de révélation jusqu'à l'apparition des bandes violettes nettes (10min environ). Elles ont été lavées 3 fois avec de l'eau distillée et séchés à l'abri de la lumière [annexe 9.5](#).

### **4.7-Gestion et analyse des données**

Les données ont été saisies dans les logiciels Microsoft office Excel 2007 et analysées avec le logiciel GraphPad-Prism 5 (San Diego, CA, USA). Après avoir vérifié que les valeurs ne suivaient pas une distribution gaussienne, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer les taux d'anticorps entre 2 groupes indépendants. Toute différence était considérée significative lorsque  $p < 0.05$ .

#### **4.8-Considérations éthiques**

Le protocole de notre étude a été approuvé par les comités d'éthiques du NIH et de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto Stomatologie (FMPOS). Il a ensuite été clairement expliqué aux autorités dirigeantes du village. La participation à l'étude était totalement volontaire, après l'obtention du consentement ou de l'assentiment individuel éclairé signé en présence d'un témoin. Il leur a été expliqué aux participants qu'ils pouvaient se retirer de l'étude à n'importe quel moment. Au cours des passages, la population a bénéficié de soins cliniques gratuits pour les affections diagnostiquées lors de l'examen clinique.

Une discrétion absolue a été faite à propos de l'identité et des résultats des différents tests des sujets ayant subi des prélèvements sanguins.

Le personnel médical au cours de cette étude était composé de médecins, de pharmaciens, de biologistes et des internes.

## 5-RESULTATS

La population des deux villages s'élevait en 2006 à 2284 habitants dont 1227 habitants pour Sougoula. Notre étude a concerné 117 sujets résidants à Sougoula et à Kéména. Les âges se situaient entre 2 et 92 ans. L'âge moyen était de 29 ans durant la période d'étude. Les résultats obtenus ont été repartis suivant la méthodologie adaptée.

### 5.1- Caractéristiques sociodémographiques de l'échantillon

**Tableau IV:** Répartition de l'échantillon par village et par sexe

Villages	Nombre=117	%
Kéména	56	48
Sougoula	61	52

Sexe	Nombre=117	%
Femmes	54	46
Hommes	63	54

Parmi les 117 sujets, 52% étaient de Sougoula et le sexe ratio était de 1,2 en faveur des hommes.

**Tableau V:** Répartition de la population d'étude par tranches d'âge

Tranche d'âge (ans)	Nombre	%
2-20	41	35
21-40	48	41
41-60	25	21,4
>60	3	2,6
Total	117	100

La tranche d'âge de 21 à 40 ans était la plus représentée (41%, n=117) de la population d'étude, tandis que le plus de 60 ans ne constituaient que 2,6%.

### 5.2-Répartition du nombre de paires de glandes salivaires par arthropodes hématophages et la concentration protéique des pools

La salive de trois arthropodes hématophages a été utilisée pour déterminer le taux anticorps IgG anti-salive chez les sujets inclus dans notre étude.

**Tableau VI:** Nombre de paires de glandes salivaires et la concentration en µg/paire.

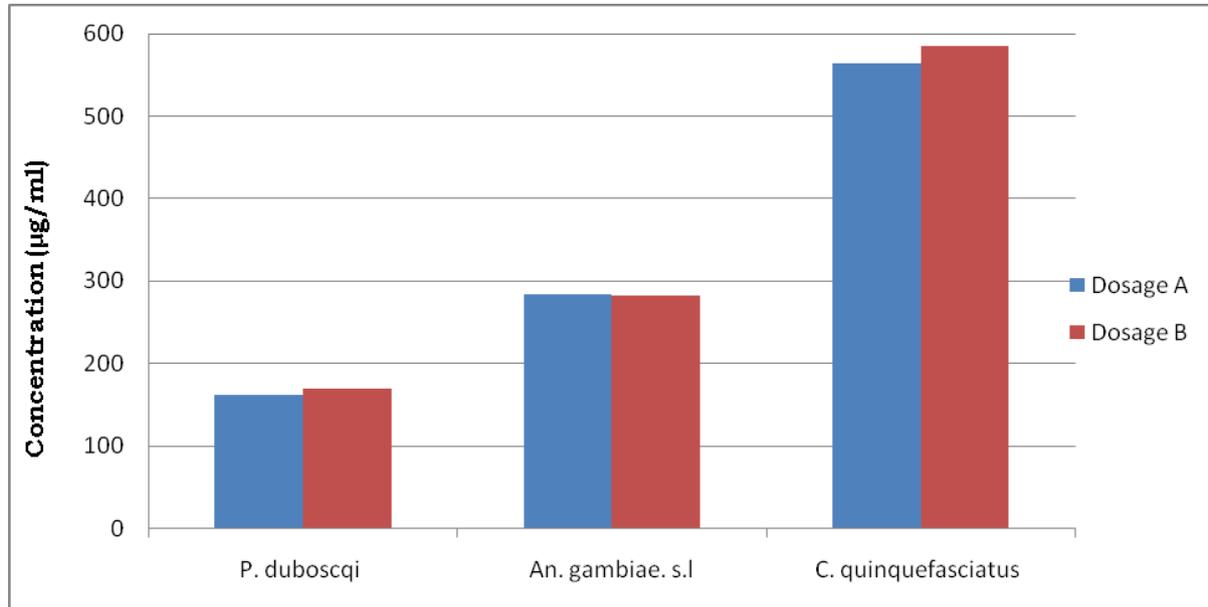
	<i>P. duboscqi</i>	<i>An. gambiae sl</i>	<i>C quinquefasciatus</i>
Paires de glandes	180	100	68
BCA (µg/paire)	0,8	2,24	5,22

BCA=Acide bicinchonimique

*P. duboscqi* présentait la plus faible concentration suivi d'*An. gambiae sl* et du *C. quinquefasciatus*.

### 5.2.1-Dosage des protéines totales dans la salive

Le dosage des protéines des pools salivaires des différents arthropodes a été effectué en duplicata (dosage A et B) et les résultats sont représentés dans la figure 9.

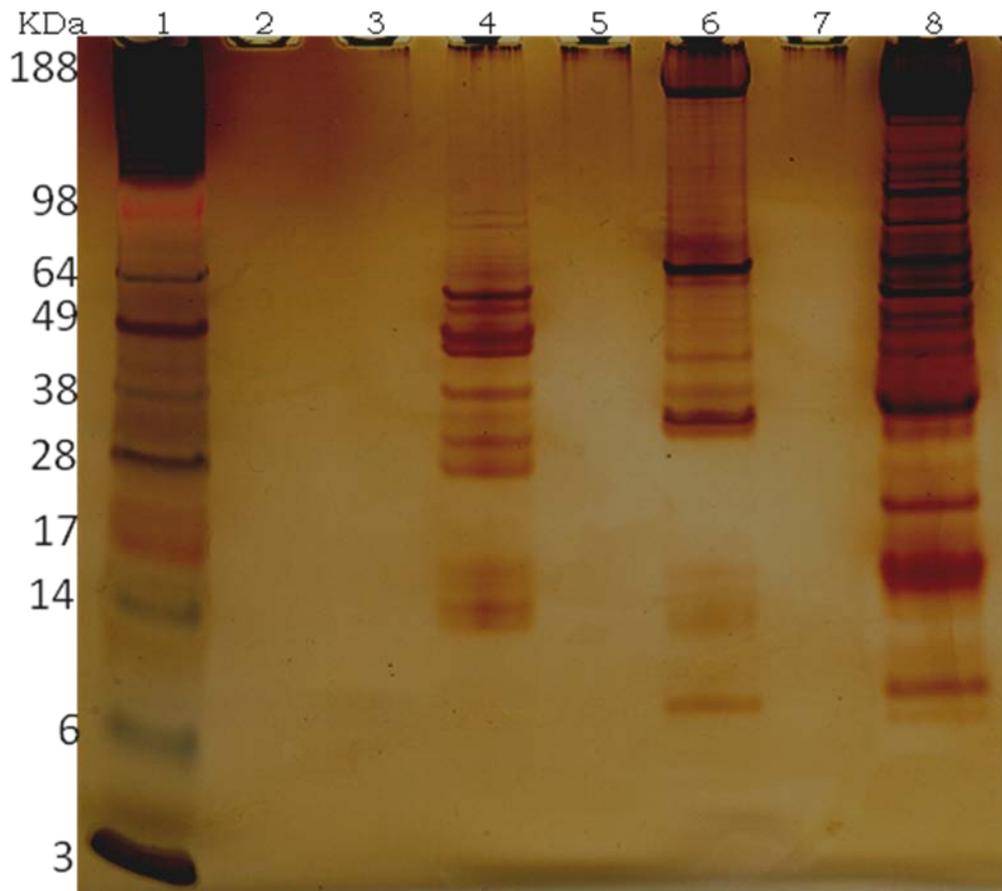


**Figure 9:** Concentration des échantillons salivaires en duplicata

Les deux dosages A et B montrent des résultats similaires pour les mêmes pools salivaires. Les concentrations en protéines des échantillons salivaires (tampon + salive) se situent entre 162 et 584 µg/ml.

### 5.2.2-Analyse de l'expression des protéines salivaires

L'équivalent de cinq paires des protéines contenues dans la glande salivaire a été révélé, pour chaque espèce. La présence et le profil de l'ensemble des protéines contenues dans la salive ont été comparés entre les trois espèces d'arthropodes.



**Figure 10:** Expression des protéines salivaires sur le gel

Le puits 1 est le marqueur de poids moléculaires (SeeBlue®Plus2®) constitué de mixture de dix protéines standard.

Les puits 2, 3, 5 et 7 sont vides pour éviter la contamination.

Le puits 4 est SGH de *Phlebotomus duboscqi*.

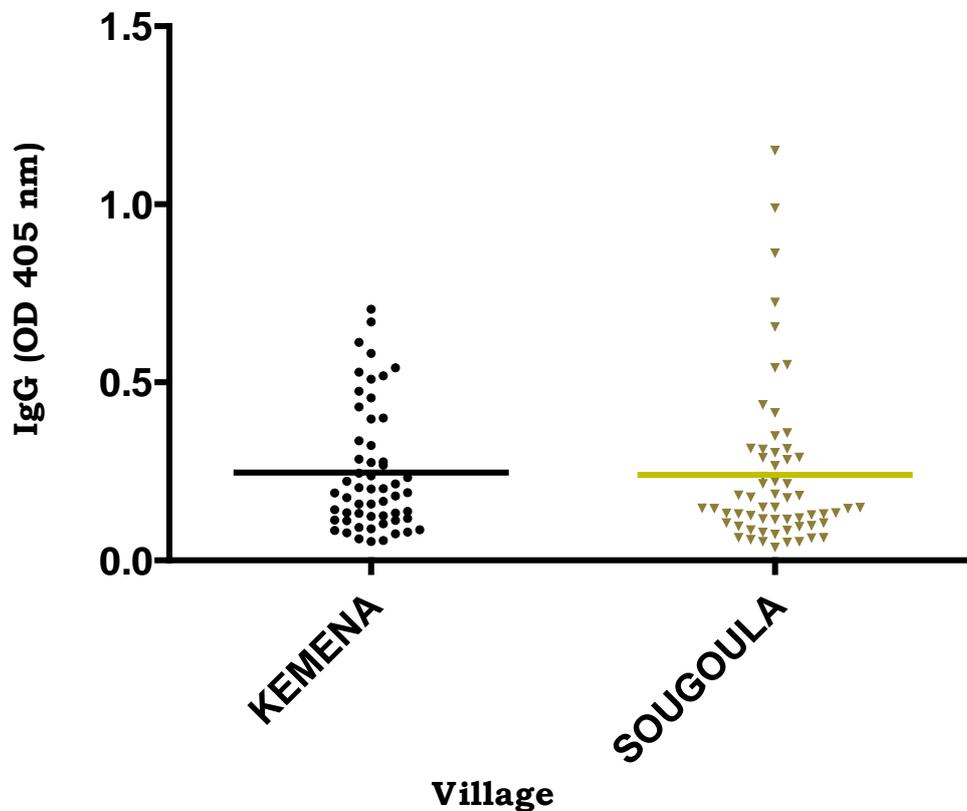
Le puits 6 est SGH d'*Anopheles gambiae sl.*

Le puits 8 est SGH de *Culex quinquefasciatus*.

La migration dénaturante des pools a permis de révéler 13 à 18 protéines suivant les espèces. L'espèce *Culex quinquefasciatus* a présenté un plus grand nombre de protéines salivaires que les autres.

### **5.3-Détermination du taux anticorps anti-salive de *P. duboscqi* dans la population de Sougoula et de Kéména**

Une comparaison du taux d'anticorps anti-salive entre les deux villages a été effectuée en utilisant l'homogénat de la glande salivaire de *P. duboscqi*.

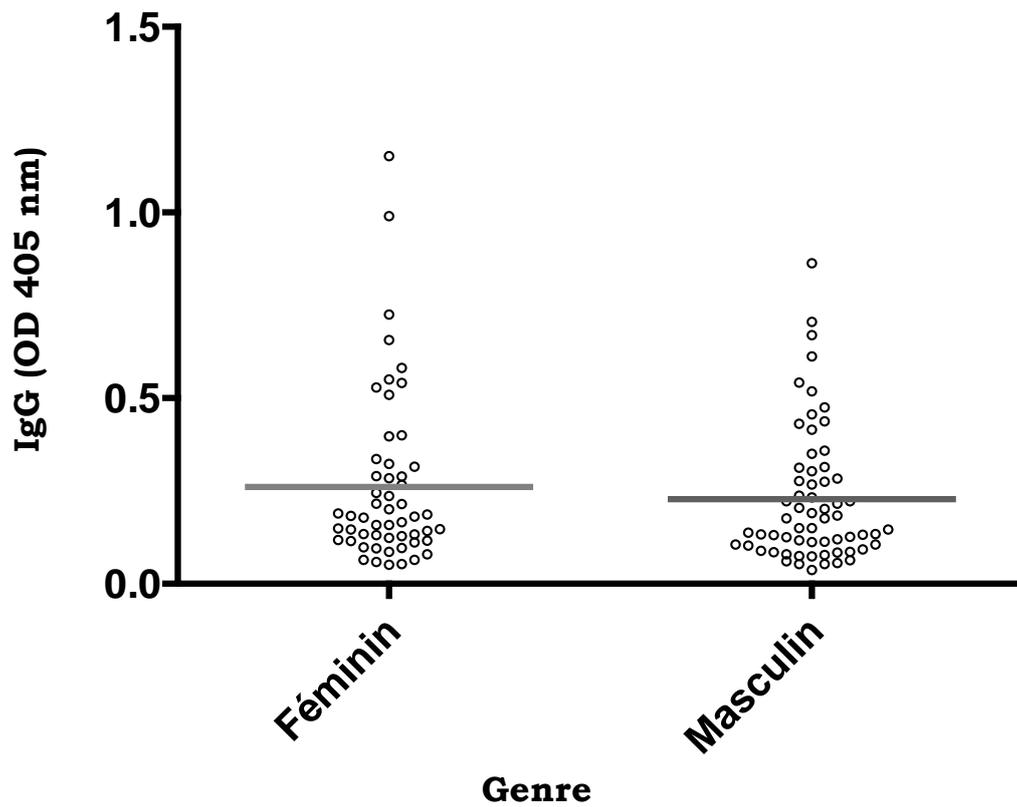


**Figure 11:** Taux d'anticorps IgG anti-salive de *P. duboscqi* par village.

Les barres indiquent la médiane du taux d'anticorps IgG anti-salivaire de *P. duboscqi* pour chaque village et le point représente un individu. Il n'y a pas de différence statistiquement significative ( $p=0,33$ ) entre les deux villages.

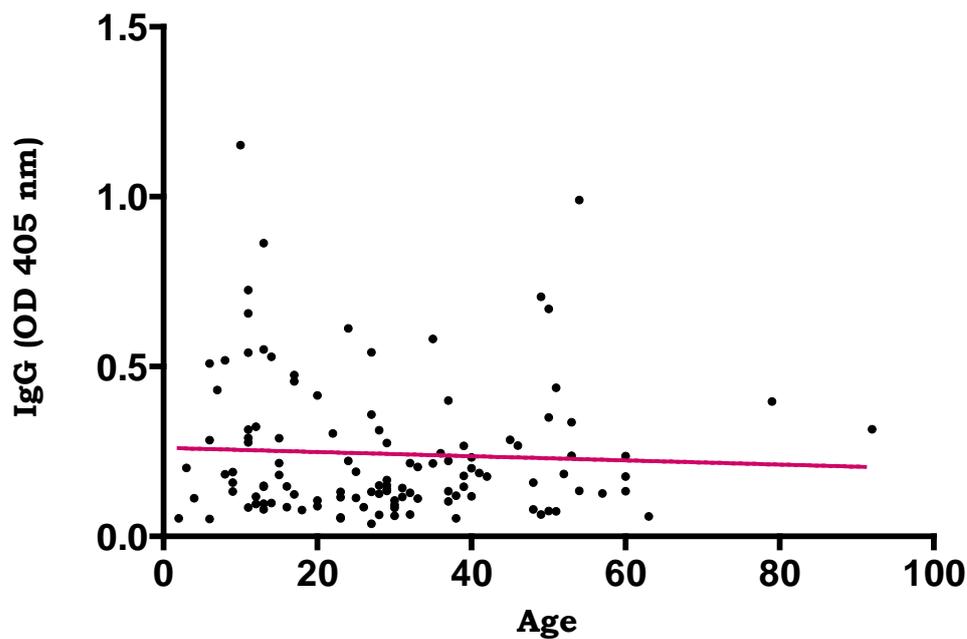
#### **5.4-Relation entre le taux d'anticorps anti-salive de *P. duboscqi* et les caractéristiques sociodémographiques de la population**

Le taux d'anticorps anti-salive de *P. duboscqi* a été évalué en fonction du sexe et l'âge des individus.



**Figure 12:** Taux d'IgG anti-salive de *P. duboscqi* selon le sexe des sujets

Les barres indiquent la valeur de la médiane du taux d'anticorps IgG anti-salivaire pour chaque genre et le point représente un individu. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative du taux IgG entre les deux sexes ( $P=0,42$ ).

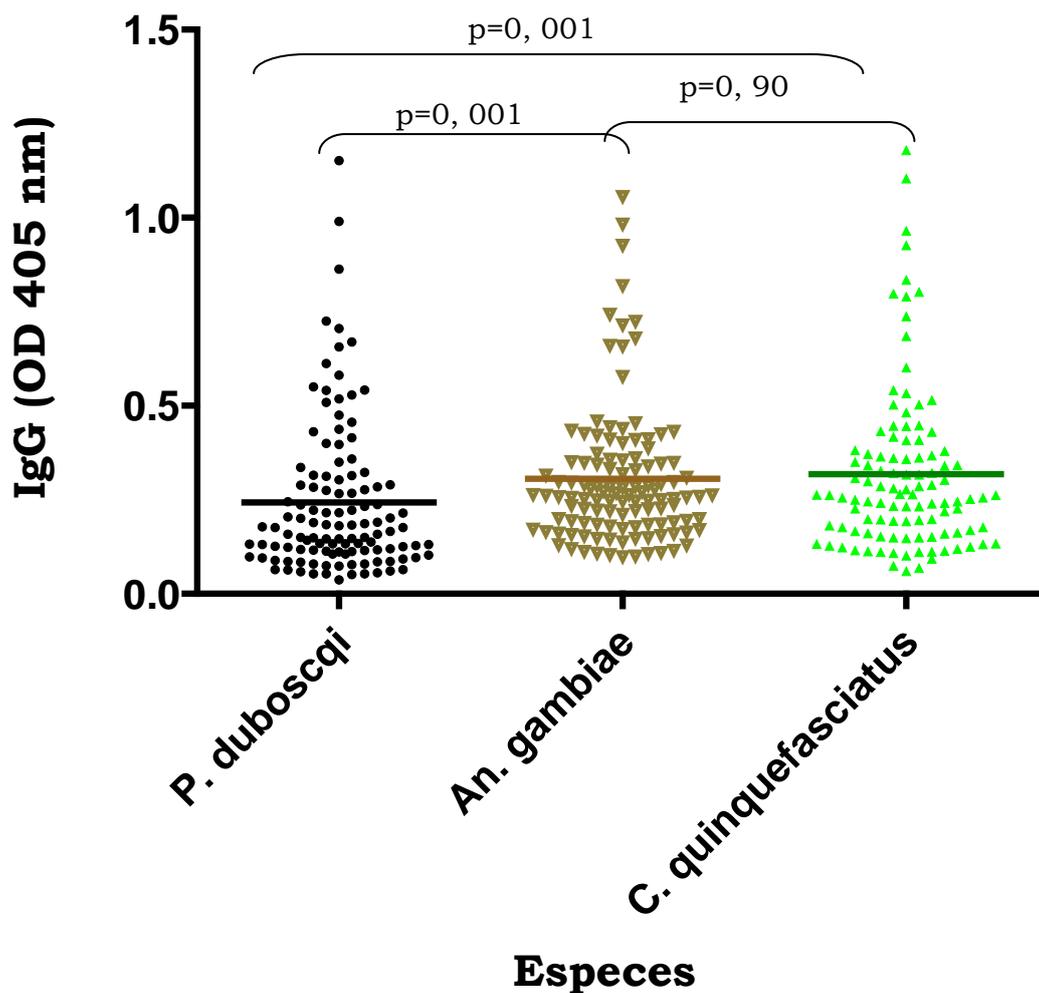


**Figure 13:** Corrélation entre le taux d'IgG anti-salive de *P. duboscqi* et l'âge

La barre indique la régression linéaire du taux IgG en fonction de l'âge et chaque point représente un individu. Le coefficient de corrélation était  $r = -0,042$  et  $p = 0,65$ . Il n'y a pas de corrélation statistiquement significative, ce qui signifie que le taux d'IgG observée n'est pas lié à l'évolution de l'âge.

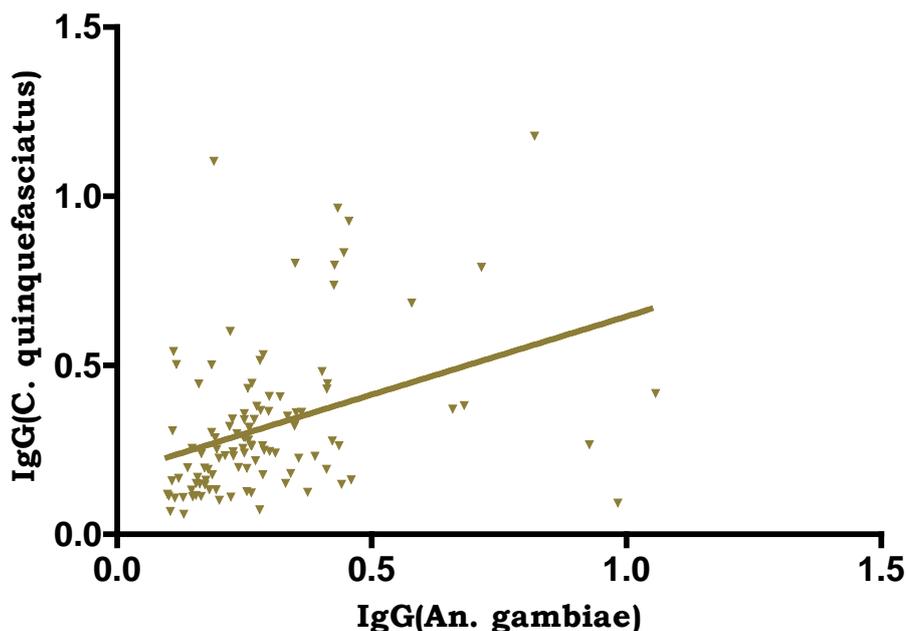
### **5.5-Détermination de la spécificité de l'anticorps anti-salive de *P. duboscqi***

A fin de nous assurer que le taux d'anticorps anti-salive observée chez les sujets était bien spécifique des protéines salivaires de *P. duboscqi*. Le taux d'anticorps vis-à-vis de la salive de deux arthropodes majeurs présents dans ces deux villages à savoir l'*An. gambiae sl* et le *Culex quinquefasciatus* a été déterminé chez ces sujets.



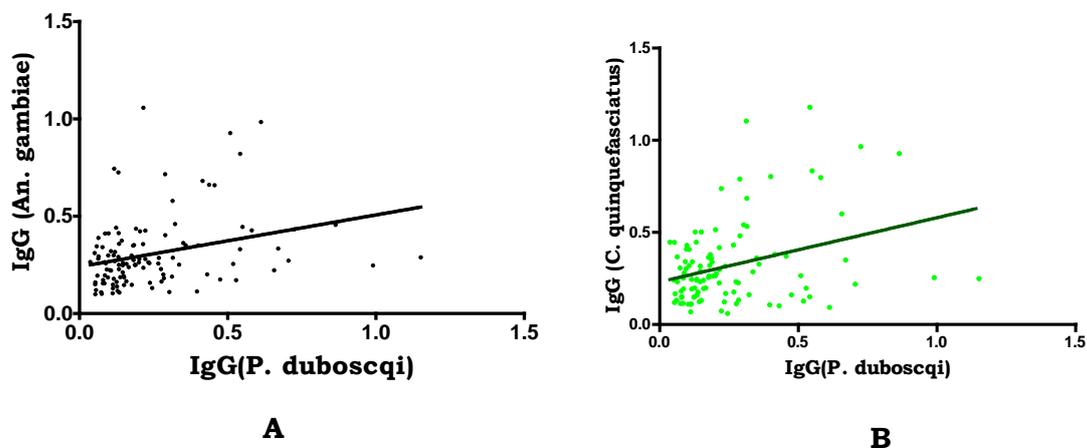
**Figure 14:** Taux d'IgG anti-salivaire aux différentes espèces (*P. duboscqi*; *An. gambiae* *sl* et *Culex quinquefasciatus*).

Les individus vivant dans ces deux localités produisaient un taux d'IgG anti-salivaire contre les trois espèces. Les barres indiquent la valeur de la médiane du taux d'anticorps IgG anti-salivaire pour chaque arthropode et les points représentent des individus. Les taux d'IgG anti-salivaire d'*An. gambiae* *sl* et de *Culex quinquefasciatus* étaient plus élevés comparés à celui de *P. duboscqi* avec une différence statistiquement significative ( $p < 0,0001$ ).



**Figure 15:** Corrélation entre le taux d'IgG anti-salive d'*An. gambiae* *sl* et celle de *Culex quinquefasciatus*.

Chaque point représente la moyenne du taux IgG anti-salive d'*An. gambiae* *sl* corrélé avec le taux IgG anti-salive de *Culex quinquefasciatus* du même individu. La barre indique la régression linéaire et le coefficient de corrélation ( $r$ ) était de 0,4574. Il y avait une corrélation statistiquement significative entre les deux variables avec une probabilité  $p=0,0001$ .



**Figure 16:** Corrélation entre le taux d'IgG anti-salive des trois arthropodes

Les régressions linaires sont indiquées par les barres et chaque point représente la moyenne du taux IgG anti-salive de *P. duboscqi* corrélé avec le taux IgG anti-salive d'*An. gambiae sl* (Figure 15A) et celui de *Culex quinquefasciatus* (Figure 15B) du même individu. Les coefficients de corrélation ( $r$ ) a été respectivement pour la Figure 15A et 15B de 0.32 ( $p=0.0004$ ) et 0.22 ( $p= 0.02$ ). Ce qui signifie qu'il y avait une corrélation statistiquement significative entre les deux variables.

### **5.5.1-Analyse de réaction croisée entre les protéines salivaires de *P. duboscqi* et *An gambiae sl* ou de *C. quinquefasciatus***

Pour savoir que la corrélation observé entre le taux d'IgG de *P. duboscqi* et les deux autres arthropodes ne se traduit pas par une réaction croisée entre les protéines salivaires. L'analyse de réaction croisée a été effectuée par LEISA et par Western blot.

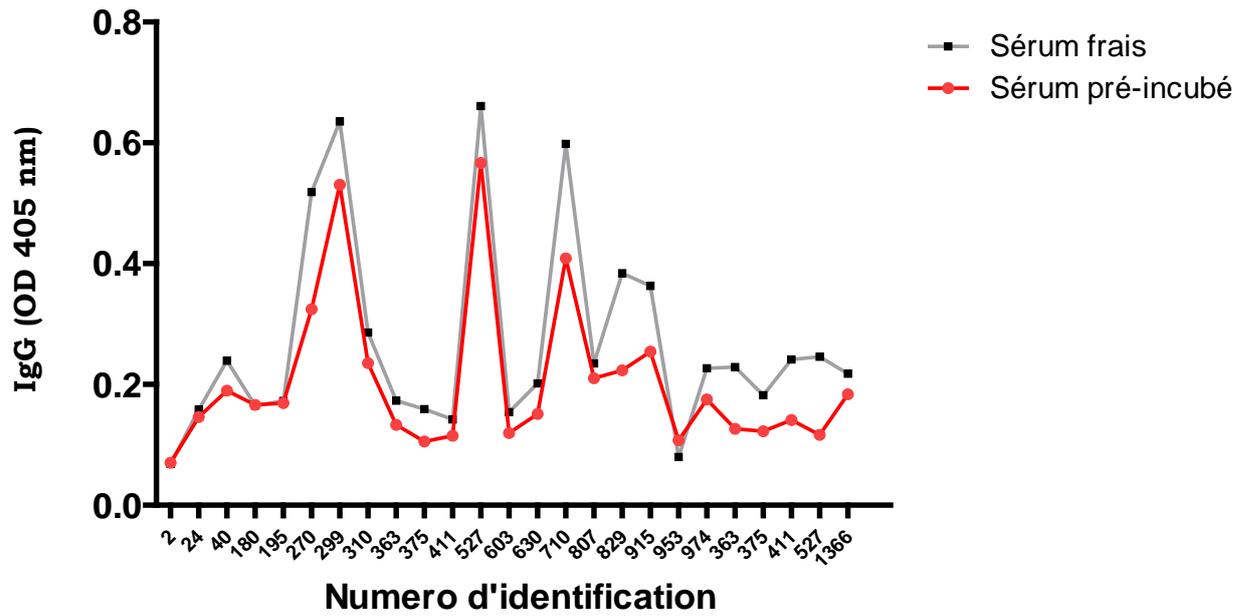
#### **5.5.1.1-Analyse de réaction croisée par la technique d'ELISA**

La spécificité des protéines salivaires de *P. duboscqi* a été évaluée chez 25 personnes qui présentaient le taux d'IgG anti-salive de *P. duboscqi* le plus élevé. Le sérum frais a été utilisé comme étant le témoin et comparé au sérum pré-incubé du même individu.

Le sérum frais était le sérum dilué à 1:50.

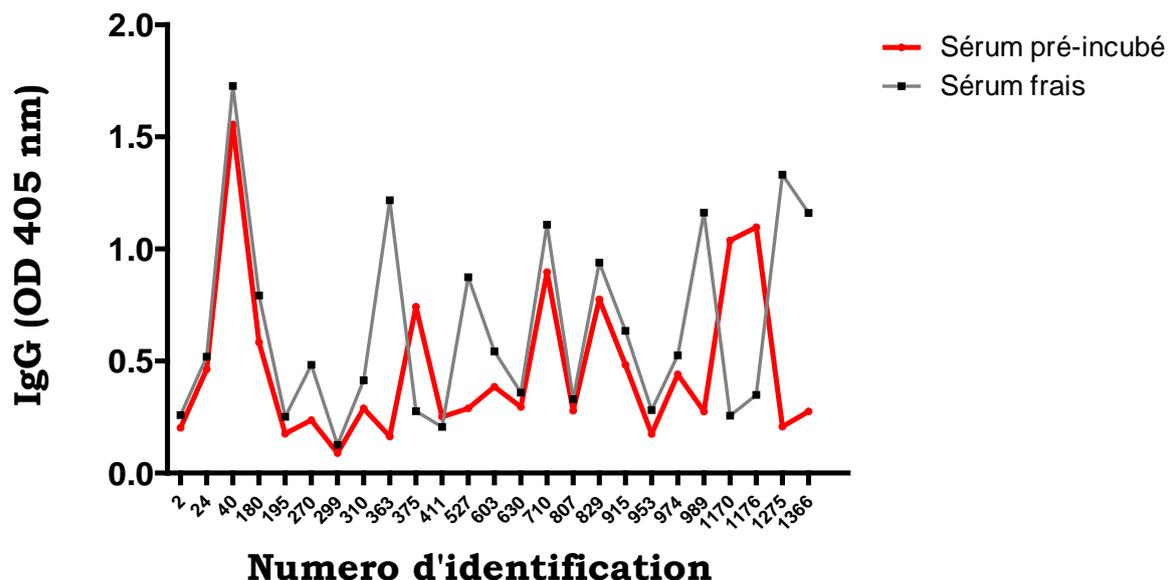
Le sérum pré-incubé était le sérum frais dilué à 1:50 et incubé contre les extraits salivaires de *P. duboscqi* pendant une heure à 37°C.

Les deux types de sera on été utilisé pour effectuer l'ELISA avec les extraits salivaires d'*An. gambiae sl* et de *C. quinquefasciatus*.



**Figure 17:** Analyse de réaction croisée entre les protéines salivaires de *P. duboscqi* et celles d'*An. gambiae sl* par ELISA

Chaque individu est représenté par deux valeurs d'IgG (sérum frais et du serum pré-incubé). Le taux d'IgG de serum pré-incubé diminuait de façon statistiquement significative ( $p=0.04$ ).



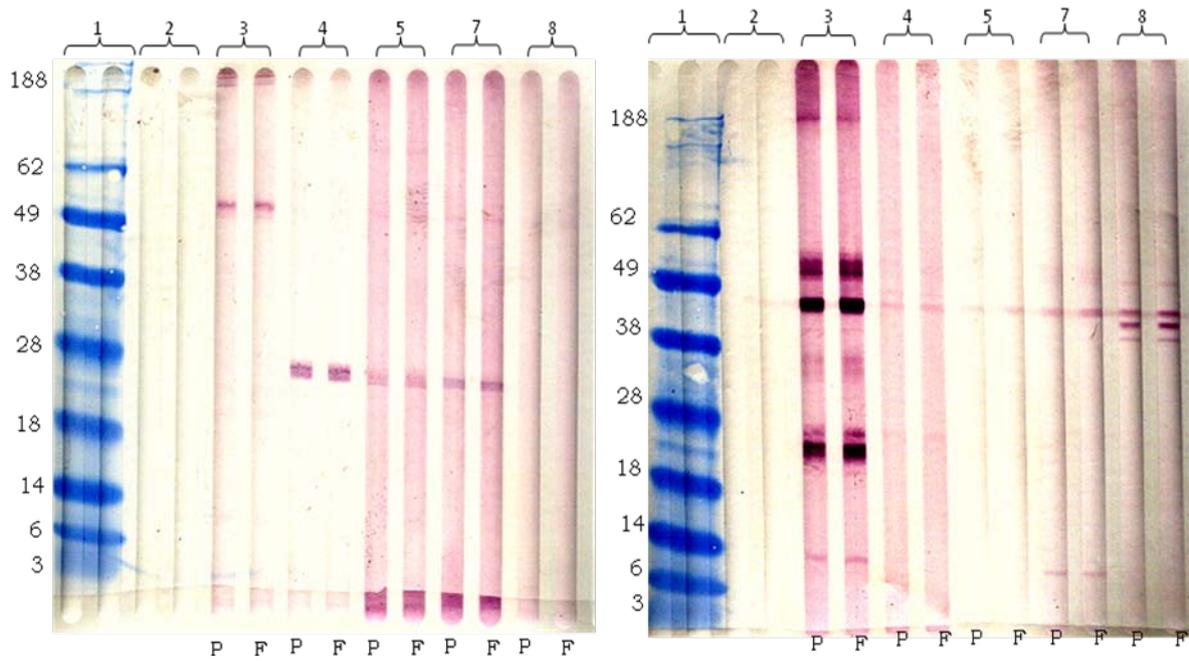
**Figure 18:** Analyse de réaction croisée entre les protéines salivaires de *P. duboscqi* et de *Culex quinquefasciatus* par ELISA

Chaque individu est représenté par deux valeurs d'IgG du sérum frais et du sérum pré-incubé. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative ( $p=0.07$ ) entre le taux d'anticorps IgG des deux types de séra. Cependant le sérum pré-incubé contre les extraits totaux de la salive de *P. duboscqi* diminuait le niveau d'IgG pour certains individus. Alors qu'il augmentait le taux d'IgG chez d'autres.

### 5.5.1.2-Analyse de réaction croisée par la technique par Western Blot

Les protéines salivaires qui sont immunogéniques ont été identifiées par la détection d'une réponse anticorps (technique d'immuno-empreinte) contre ces protéines chez des personnes

L'immuno-empreinte a été déterminé chez cinq sujets. Ces personnes présentaient une différence élevée entre le taux d'IgG de sérum frais et de sérum pré-incubé. On a utilisé le sérum frais comme témoin et le sérum pré-incubé d'un même individu pour faire le Western Blot avec les extraits salivaires de *P. duboscqi*, d'*An. gambiae sl* et de *C. quinquefasciatus*.

Salive *An. gambiae sl*Salive *Culex quinquefasciatus*

**Figure 19:** Western blot avec les extraits salivaires d'*An. gambiae sl*, de *Culex quinquefasciatus*.

Les colonnes 1 représentent le marqueur de poids moléculaires.

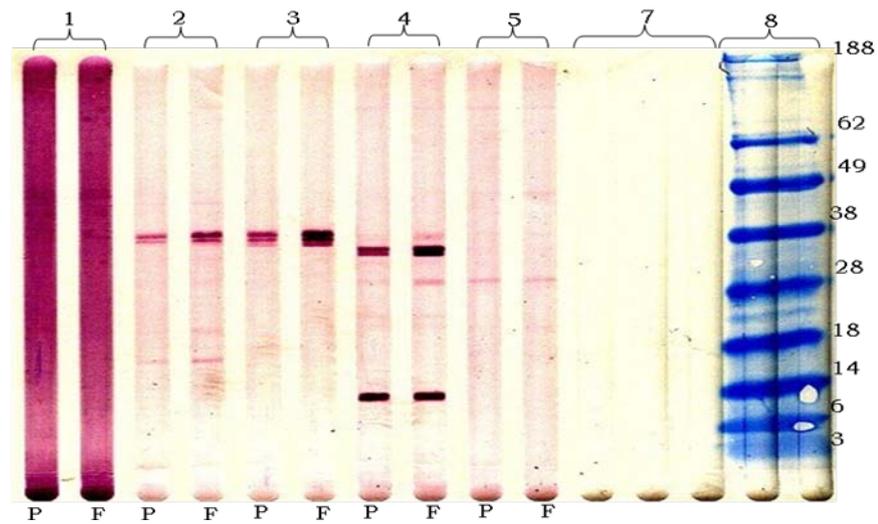
Les colonnes 2 sont des puits vides pour éviter la contamination.

Les colonnes 3 à 8 représentent les échantillons.

F est le sérum frais

P est le sérum pré-incubé

Il n'existait pas de différence entre la taille et d'intensité des bandes de sérum frais et de sérum pré-incubé d'un même individu.



Salive de *P. duboscqi*

**Figure 20:** Western blot avec les extraits salivaires de *P. duboscqi*.

Les colonnes 8 représentent le marqueur de poids moléculaires.

Les colonnes 7 sont des puits vides pour éviter la contamination.

Les colonnes 1 à 5 représentent les échantillons.

F est le sérum frais

P est le sérum pré-incubé

On constatait une diminution de la concentration des bandes de sérum pré-incubé comparées aux bandes de sérum frais du même individu.

## **6-Commentaires et discussion**

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'une surveillance active de la leishmaniose cutanée menée en 2004 par une équipe conjointe du MRTC, du CNAM et du NIH dans deux villages du cercle de Barouéli (Kéména et Sougoula) dans la région de Ségou au Mali.

C'était une d'étude transversale qui s'est déroulée dans un premier temps en mars 2009 où des prélèvements de sang ont été effectués et dans un second temps en juin 2009 où a eu l'identification des arthropodes hématophages dans les deux villages.

La population d'étude provenait respectivement de Sougoula 52% (61/117) et de Kéména 48% (56/117). Le sexe ratio était de 1,2 en faveur des hommes (Tableau IV). L'âge de notre population d'étude était compris entre 2 et 92 ans. La tranche d'âge de 21-40 ans représentait 41% de la population d'étude suivi de celle de 2-20 (35%).

Les contacts antérieurs avec la population de Kéména et de Sougoula lors de l'étude de l'incidence de l'exposition au parasite et des aspects cliniques de la leishmaniose cutanée ont facilité la réalisation de cette étude. Le protocole de notre étude a été approuvé par les comités d'éthiques du NIH et de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS).

Un consentement individuel éclairé a été signé par chaque sujet inclus dans cette étude. La formation des investigateurs aux Bonnes Pratiques Cliniques et à la méthodologie de recherche ont contribué à la réussite de cette étude.

### **L'extraction des glandes salivaires des différents arthropodes.**

Pour commencer ce travail, les arthropodes hématophages ont été identifiés dans les deux villages. Les glandes salivaires des arthropodes hématophages identifiées dans les deux villages ont été extraites à savoir *P. duboscqi*, *Culex sp* et *An. gambiae sl*. Ces arthropodes utilisés provenaient de l'insectarium

des instituts nationaux de santé (NHI) des Etats-Unis d'Amérique. L'espèce *Culex sp* retrouvé dans les deux villages n'ayant pas été identifié, le *Culex quinquefasciatus* était utilisé.

La concentration protéique des pools variait de 0,8 $\mu$ g/paire de glande salivaire pour *P. duboscqi* à 5,22 $\mu$ g/paire pour *Culex quinquefasciatus*. Ceci pourrait être expliqué par la différence de structure des glandes salivaires des arthropodes.

La migration dénaturante des cinq paires de glandes salivaires de chaque pool a permis de révéler 13 à 19 protéines suivant les espèces. Ce qui veut dire que la technique de dissection utilisée pour cette étude permet de recueillir un grand nombre de protéines salivaires pour l'utilisation de notre technique (Figure 9).

### **Evaluation de la relation entre le taux d'IgG anti-salive de *P. duboscqi* et les caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude**

Les individus vivants à Sougoula et à Kéména produisaient des anticorps IgG dirigés contre les extraits salivaires totaux de *P. duboscqi*. Le taux IgG ne variait pas de façon significative entre les deux villages ( $p=0.33$ ), aussi bien qu'entre les deux sexes ( $p =0.42$ ). Ceci pourrait s'expliquer par la grande proximité et la similarité des caractéristiques sociodémographiques entre les villages.

Le taux d'IgG anti-salive de *P. duboscqi* a été analysé en fonction de l'âge des individus. Aucune influence de l'âge sur le développement du taux anticorps IgG anti-salive n'a été observée dans la population étudiée ( $r=-0.042$ ; Figure 13). Ce résultat était comparable à celui déjà décrit en Angola par Dramé (2006) sur le taux d'IgG anti-salive d'*An. gambiae sl* [63].

### **Détermination de la spécificité du taux d'anticorps anti-salive de *P. duboscqi***

Un même individu vivant à Sougoula et à Kéména produisait des anticorps IgG dirigés contre les extraits salivaires totaux de *P. duboscqi*, d'*An. gambiae sl* et de *Culex quinquefasciatus*. L'anticorps IgG anti-salive de *P. duboscqi* était significativement faible comparée à celui d'*An. gambiae sl* ( $p < 0.0001$ ) ou de *Culex quinquefasciatus* ( $p < 0.0001$ ; Figure 14). Cette différence significative pourrait être due à une forte exposition de la population aux piqûres d'*An. gambiae sl* et *C. quinquefasciatus*. Une autre étude avait indiqué que le niveau d'IgG spécifique aux protéines salivaires d'*An. gambiae sl* apparaît positivement associé au degré d'exposition des individus (Remoue et al. 2006). Mais il n'existait pas de données disponibles sur la densité des deux moustiques comparées à celle des phlébotomes dans ces villages.

Les coefficients de corrélations entre le taux anticorps IgG anti-salive de *P. duboscqi* et celle d'*An. gambiae sl* ( $r = 0.3236$ ;  $p = 0.0194$ ) ou de *Culex quinquefasciatus* ( $r = 0.22$ ;  $p = 0.0004$ ) était faible mais statistiquement significative (Figure 14). Cependant, cette corrélation était plus accentuée entre l'*An. gambiae sl* et *Culex quinquefasciatus* avec  $r = 0.46$  et restait statistiquement significatif  $p = 0.0001$  (Figure 15).

### **Analyse des réactions croisées entre les protéines salivaires des différents vecteurs hématophages.**

Les réactions croisées possibles entre les protéines salivaires de *P. duboscqi* et celles de *Culex quinquefasciatus* et d'*An. gambiae sl* ont été recherchées chez les sujets. C'est ainsi que la différence entre le taux IgG du sérum pré-incubé contre les protéines salivaires de *P. duboscqi* et celle au sérum frais du même individu a été déterminée. Une diminution du taux d'IgG anti-salive d'*An. gambiae sl* ou de *Culex quinquefasciatus* dans les sera pré-incubés a été constaté, pendant qu'elle avait augmenté chez certains. Il a

également été constaté qu'elle restait similaire chez certaines personnes (Figure 17 et 18).

Par contre, le résultat du Western blot a montré qu'il n'y avait pas de différence statistiquement entre les immuno-empreintes d'*An. gambiae* sl sérum pré-incubé et frais. Ce constat était le même pour l'immuno-empreinte de *Culex quinquefasciatus* (Figure 19). Toutefois, l'intensité des bandes de l'immuno-empreinte de *P. duboscqi* de sérum pré-incubé était faible lorsqu'on le compare à la bande de sérum frais (Figure 20). Ceci pourrait signifier que les anticorps fixés sur les antigènes lors de la pré-incubation du sérum contre les protéines salivaires de *P. duboscqi* étaient des anticorps de salive de *P. duboscqi*. Cependant, avec les conditions expérimentales utilisées, nous pouvons suggérer que les signaux d'immunogénicité observés lors des immuno-empreintes semblent spécifiques aux protéines salivaires de *P. duboscqi*.

Le manque de control positif et négatif des séra et le non identification de l'espèce *Culex sp* retrouvé dans les villages consistaient les limitées de cette étude.

## **7-Conclusion et recommandations**

L'étude des protéines salivaires apparaît comme une voie de recherche prometteuse. La mise au point d'un marqueur immunologique permettrait d'identifier au niveau d'une population les groupes d'exposition au vecteur infecté et de suivre ces individus à risque en priorité. Dans cette étude, il a été démontré que les individus vivants dans deux localités proches produisaient des anticorps IgG contre les extraits salivaires de *P. duboscqi*, d'*An. gambiae sl* et de *Culex quinquefasciatus*.

Les résultats auxquels nous sommes parvenus démontrent qu'il n'existait pas de corrélation entre l'âge et le taux d'IgG anti-salive de *P. duboscqi*.

Nos deux villages d'étude n'étant distants que de 5 km présenteraient le même niveau d'exposition à la piqûre de *P. duboscqi*.

Au cours de cette étude, il a été observé que la réaction immunologique croisée entre les protéines salivaires des différentes espèces semblait très faible ou inexistante dans notre condition expérimentale. Le taux IgG évaluée à partir des extraits salivaires totaux de *P. duboscqi* serait donc spécifique aux piqûres de *P. duboscqi*.

### **Au terme de cette étude et vu nos résultats nous recommandons aux :**

**Populations** l'utilisation de mesures de protection individuelle contre les piqûres des insectes.

**Chercheurs** plus d'investigations afin de mieux comprendre la relation immunologique homme-vecteur.

**Aux autorités politiques**, d'appuyer les chercheurs dans la mise au point d'un vaccin à base des protéines salivaires pour éradication des leishmanioses.

**8-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Dedet, J.P., *Leishmanies, Biologie, clinique et thérapeutique*, in *Maladies infectieuses*, E.M. Chir, Editor. 2001. p. 11
2. Roberts, L.S.J., J.J; Gerald D. Schmidt ; Larry S. , *Roberts' Foundations of Parasitology* McGraw-Hill Higher Education, 2000.
3. Aubry, P., *Leishmanioses Actualités*. Medecine tropicale, 2008.
4. Titus, R.G., J.V. Bishop, and J.S. Mejia, *The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission*. Parasite Immunol, 2006. 28(4): 131-41.
5. Brossard, M. and P. Girardin, *Passive transfer of resistance in rabbits infested with adult Ixodes ricinus L: humoral factors influence feeding and egg laying*. Experientia, 1979. 35(10): 1395-7.
6. Imperato, P.J., Fofana, B.Sow, O.Diallo, S. *Leishmanin skin sensitivity in the inland delta of the Niger*. Trop Geogr Med, 1974. 26(3): 303-6.
7. Imperato, P.J. and M. Bradrick, *Leishmanin skin sensitivity in Timbuctoo*. Medecine tropicale, 1969. 72(9): 216-8.
8. Theodos, C.M., J.M. Ribeiro, and R.G. Titus, *Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice*. Infect Immun, 1991. 59(5):1592-8.
9. KEITA S, Faye.O., N'DIAYE HT, KONARE HD, *Epidémiologie et polymorphisme clinique de la leishmaniose cutanée observée au CNAM, Mali Médical*, 2003.
10. Samake, S., *Epidemiologie de la leishmaniose cutanée à Kéména et Sougoula (CERCLE DE BAROUELI), these de Pharmacie*. 2006, FMPOS: Bamako. p. 121.
11. Sissoko I, *Etude du rôle de P. duboscui dans la transmission de la L. C au Mali, Master Entomologie medicale*. 2007, INSP d'OUIDAH: Bénin. p. 59.
12. Dembélé, S., *L'intérêt d'un traitement de la forme cutanée par le 4-4 diamino diphényl sulfone à Bamako (Institut Marchoux), these Médecine*. 1992, FMPOS: Bamako, (Mali).

13. Diarra, S., *Etude de l'incidence de l'exposition au parasite et les aspects cliniques de la leishmaniose cutanée en zone endémique de Barouéli (Kéména & Sougoula)*, these de Medicine. 2008, FMPOS: Bamako. p. 89.
14. Belkaid, Y., et al., *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, 1998. 188(10): 1941-53.
15. Belkaid, Y. Kamhawi, S. Modi, G. Valenzuela, J. Noben-Trauth, N. Rowton, E. Ribeiro, J. Sacks, D. L., *Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies*. Science, 2000. 290(5495): p. 1351-4.
16. Valenzuela, J. G. Belkaid, Y. Garfield, M. K. Mendez, S. Kamhawi, S. Rowton, E. D. Sacks, D. L. Ribeiro, J. M., *Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein*. J Exp Med, 2001. 194(3): 331-42.
17. Kamhawi, S., *The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of Leishmania infections*. Microbes Infect, 2000. 2(14): 1765-73.
18. Rogers, K.A. and R.G. Titus, *Immunomodulatory effects of Maxadilan and Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses*. Parasite Immunol, 2003. 25(3): 127-34.
19. Dedet, J.P., et al., *Cutaneous leishmaniasis. The parasite*. Clin Dermatol, 1999. 17(3): 261-8.
20. Killick-Kendrick, R., *Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review*. Med Vet Entomol, 1990. 4(1): p. 1-24.
21. Pinto, M.C, Campbell-Lendrum, D. H. Lozovei, A. L. Teodoro, U. Davies, C. R. *Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field*. Med Vet Entomol, 2001. 15(2): 132-9.
22. Desjeux, P., *The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. 95(3): 239-43.

23. Vannier-Santos, M.A., A. Martiny, and W. de Souza, *Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading*. *Curr Pharm Des*, 2002. 8(4): 297-318.
24. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. *Immunol Microbiol Infect Dis*, 2004. 27(5):. 305-18.
25. Didier Basset, F.P., Christophe Ravel, Jacques Dereure et Jean-Pierre Dedet. *leishmanioses en France: synthèse des données recueillies de 2001 à 2003 au Centre national de référence des Leishmania*. 2003
26. Handman, E., *Leishmaniasis: current status of vaccine development*. *Clin Microbiol Rev*, 2001. 14(2): 229-43.
27. Diakitè, I.P.J.S., *Leishmaniasis in the Republique of Mali*. *Tropical Medicine and Hygiene*, 1969. 236-24: 63.
28. Ribeiro, J.M., T.M. Endris, and R. Endris, *Saliva of the soft tick, Ornithodoros moubata, contains anti-platelet and apyrase activities*. *Comp Biochem Physiol A Physiol*, 1991. 100(1): 109-12.
29. Cross, M. L. Cupp, M. S. Cupp, E. W. Galloway, A. L. Enriquez, F. J., *odulation of murine immunological responses by salivary gland extract of Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae)*. *J Med Entomol*, 1993. 30(5): 928-35.
30. Charlab, Charlab, R. Valenzuela, J. G. Rowton, E. D. Ribeiro, J. M., *Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly Lutzomyia longipalpis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(26): 15155-60.
31. Champagne, D. E. Smartt, C. T. Ribeiro, J. M. James, A. A., *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*, 1995. 92(3): p. 694-8.
32. Nascimento, E.P., R. dos Santos Malafronte, and O. Marinotti, *Salivary gland proteins of the mosquito Culex quinquefasciatus*. *Arch Insect Biochem Physiol*, 2000. 43(1): 9-15.
33. Sarkis, J.J., J.A. Guimaraes, and J.M. Ribeiro, *Salivary apyrase of Rhodnius prolixus. Kinetics and purification*. *Biochem J*, 1986. 233(3): 885-91.

34. Mant, M.J. and K.R. Parker, *Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (Glossina) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in in vitro platelet aggregation*. Br J Haematol, 1981. 48(4): 601-8.
35. Ribeiro, J.M., *Ixodes dammini: salivary anti-complement activity*. Exp Parasitol, 1987. 64(3): 347-53.
36. Valenzuela, J.G. and J.M. Ribeiro, *Purification and cloning of the salivary nitrophorin from the hemipteran Cimex lectularius*. J Exp Biol, 1998. 201(Pt 18): 2659-64.
37. Cupp, E.W., M.S. Cupp, and F.B. Ramberg, *Salivary apyrase in African and New World vectors of Plasmodium species and its relationship to malaria transmission*. Am J Trop Med Hyg, 1994. 50(2): 235-40.
38. Ribeiro, J.M.C., Rossignol PA, Spielman A. *Salivary gland apyrase determines probing time in anopheline mosquitoes*. Journal of Insect Physiology, 1985(689-692): 31.
39. Valenzuela, J.G., et al., *The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera*. Insect Mol Biol, 2002. 11(2): 149-55.
40. Lerner, E.A. and C.B. Shoemaker, *Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide*. J Biol Chem, 1992. 267(2): 1062-6.
41. Titus, R.G. and J.M. Ribeiro, *Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity*. Science, 1988. 239(4845): 1306-8.
42. Colman, R.W. and A.H. Schmaier, *Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes*. Blood, 1997. 90(10): 3819-43.
43. O'Flaherty, J.T. and J.F. Cordes, *Human neutrophil degranulation responses to nucleotides*. Lab Invest, 1994. 70(6): 816-21.
44. Cook, S.P. and E.W. McCleskey, *Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP*. Pain, 2002. 95(1-2): 41-7.
45. Millan, M.J., *The induction of pain: an integrative review*. Prog Neurobiol, 1999. 57(1): p. 1-164.

46. Arca, B., Lombardo, F., Lanfrancotti, A., Spanos, L., Veneri, M., et al., *A cluster of four D7-related genes is expressed in the salivary glands of the African malaria vector Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 2002. 11:47-55.
47. Kato, H. Anderson, J. M. Kamhawi, S., *High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant Phlebotomus duboscqi sandflies populations (Mali and Kenya)* *BMC Genomics*, 2006. 7: p. 226.
48. Calvo, E., Debianchi, A. G., James, A. A. and Marinotti, O, *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* 2002. 32(11): p. 1419-27.
49. Calvo, E., Mans, B. J., Andersen, J. F. and Ribeiro, J. M, *Function and evolution of a mosquito salivary protein family*. *J Biol Chem*, 2006. 281(4): 1935-42.
50. Menon, J.N. and P.A. Bretscher, *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*, 1996. 26(1): 243-9.
51. Oliveira, F. Lawyer, P. G. Kamhawi, S. Valenzuela, J. G. , *Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-Leishmania immune response towards protection or exacerbation of disease*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008. 2(4): 226.
52. Mbow, M. L. Bleyenbergh, J. A. Hall, L. R. Titus, R. G., *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*, 1998. 161(10): 5571-7.
53. Qureshi, A. A. Asahina, A. Ohnuma, M. Tajima, M. Granstein, R. D. Lerner, E. A., *Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts*. *Am J Trop Med Hyg*, 1996. 54(6): 665-71.

54. Theodos, C.M. and R.G. Titus, *Salivary gland material from the sand fly Lutzomyia longipalpis has an inhibitory effect on macrophage function in vitro*. Parasite Immunol, 1993. 15(8): 481-7.
55. Hall.L.R, *Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of Leishmania major and nitric oxide production*. Journal of Immunology, 1995. 155: 3501-3506.
56. Bissonnette, E.Y., P.A. Rossignol, and A.D. Befus, *Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells*. Parasite Immunol, 1993. 15(1): 27-33.
57. Vaughan, J. A. Scheller, L. F. Wirtz, R. A. Azad, A. F., *Infectivity of Plasmodium berghei sporozoites delivered by intravenous inoculation versus mosquito bite: implications for sporozoite vaccine trials*. Infect Immun, 1999. 67(8): 4285-9.
58. Valenzuela, J. G. Belkaid, Y. Rowton, E. Ribeiro, J. M., *The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly Phlebotomus papatasi belongs to the novel Cimex family of apyrases*. J Exp Biol, 2001. 204(Pt 2): 229-37.
59. Schneider, B. S. McGee, C. E. Jordan, J. M. Stevenson, H. L. Soong, L. Higgs, S., *Prior exposure to uninfected mosquitoes enhances mortality in naturally-transmitted West Nile virus infection*. PLoS One, 2007. 2(11): e1171.
60. MANSION-BAHR, P.C., *Diagnosis*. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Peters W. & Killick-Kendrick R, 1987. II: p. 703-729.
61. Ahmed, *Leishmaniasis survey in the Awash Valley: The magnitude of positive leishmanin reaction and its pattern in the Middle Awash*. Health.Dev, 2002: 157-163.
62. Killick-Kendrick, R. Killick-Kendrick, M. Pinelli, E. Del Real, G. Molina, R. Vitutia, M. M. Canavate, M. C. Nieto, J., *A laboratory model of canine leishmaniasis: the inoculation of dogs with Leishmania infantum promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies*. Parasite, 1994. 1(4): 311-8.
63. Drame PM, Poinsignon A, Besnard P, Le Mire J., *Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to Anopheles bites*. Malar J, 2009. 8: 198.

## **9. ANNEXES**

### **9.1-Dosage des protéines totales.**

#### **Principe**

C'est une technique qui est basée sur le test de l'acide bicinchoninique pour la détection de la coloration et quantification des protéines. Cette méthode est combinée la réduction du cuivre qui est proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques a une température  $>37^{\circ}\text{C}$ . Ensuite 2 molécules de BCA chélate spécifiquement  $\text{Cu}^{+1}$  et le complexe absorbe à 405nm.

#### **Matériel**

- Spectrophotomètre de masse
- Plaque ELISA
- BCA™ protein assay Kit (Pierce)

#### **Procédure**

- Réaliser une gamme de dilution de l'échantillon standard (BSA à 2 mg/ml) de 0 à 2 mg/ml (2000, 1000, 500, 250, 175, 87.5, 43.75, 21.875 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), dans le tampon de l'échantillon à doser.
- Préparer la solution BCA avec les réactifs A et B 50 :1
- Mettre 10 $\mu\text{l}$  des chaque standard dilué (BSA) dans les puits de la plaque de 96 puits (Faire en duplicata).
- Mettre 10 $\mu\text{l}$  de chaque échantillon (SGH) dans les puits de la plaque de 96 puits (Faire duplicata).
- Mettre 10 $\mu\text{l}$  du blanc (PBS) dans les puits de la plaque de 96 puits (Faire duplicata).
- Ajouter 200 $\mu\text{l}$ /puits de la solution BCA préparée.
- Couvrir la plaque et vortex.
- Placer la plaque dans l'étuve à  $37^{\circ}\text{c}$  pendant 30 minutes.
- Refroidir ensuite la plaque à température ambiante.
- Lire la microplaque à 405 nm à l'aide d'un lecteur ELISA.

#### **Résultats et interprétation**

- Enregistrer la densité optique dans chaque puits et calculer la moyenne des valeurs doubles.

- Pour chaque échantillon, les doubles ne devront pas diverger de plus de 15% de la valeur de la moyenne. Si la divergence est supérieure, le dosage devra être répété.
- Les valeurs moyennes de densité optique obtenues pour chaque échantillon doivent être interpolées sur la courbe d'étalonnage.

### **Avantages et inconvénients**

Cette méthode est très sensible jusqu'à 2mg/ml et peu sensible aux détergents. Cependant, certaines substances tel que l'acide ascorbique, fer, lipides, cystéine ne doivent être utilisé comme composants du tampon de l'échantillon. Elles peuvent interfèrent dans cet essai et peuvent mener à de faux résultats.

### **Conclusion**

Toutes les valeurs de densités optiques comprises entre la gamme de dilution de 20 µg/ml à 2 mg/ml étaient considérée positives.

## **9.2- Electrophorèse sur gel et révélation des protéines (*Silver® staining*)**

### **Principe**

C'est technique qui permet la separation des protéines salivaires en fonction de leur poids moléculaire (PM) sur un gel et de les rendre visible grace a la coloration au nitrate d'argent.

### **Matériel et réactifs**

- Cuve d'électrophorèse
- Gel préfabriqué (NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gels)
- Tampon d'électrophorèse (MES SDS ; Eau pure)
- Marqueur de masse moléculaire (SeeBlue®Plus®)
- Agent réducteur [NuPAGE® Reducing Agent (10X)]
- Tampon de traitement [NuPAGE® LDS (4X)]

### **Procédure**

- Calculer le volume équivalent de 5 paires de glandes salivaires.
- Ajouter l'équivalent de 1x du tampon de traitement.

- Ajouter l'équivalent de 1x de l'agent réducteur.
- Centrifuger et mettre à 70°C pendant 10 min.
- Monter la cuve d'électrophorèse.
- Placer le gel dans la cuve.
- Remplir la cuve de tampon d'électrophorèse.
- Déposer les échantillons et le marqueur dans les puits.
- Brancher le générateur à la cuve.
- Régler le générateur sur 200V.
- Faire migrer jusqu'à ce que le fond de migration indique par le Bleu de Bromophenol, arrive en bas du gel
- **Résultats et interprétation**

La révélation de l'ensemble des protéines est effectuée par une technique de coloration au nitrate d'argent.

<b>Etape</b>	<b>Réactif</b>	<b>Protocole</b>
Fixation	Ethanol 40 ml Acide acétique 10 ml Eau 50 ml	Mettre 100 ml, agiter le gel pendant 20 min
Lavage	Ethanol 30 ml Eau 70 ml	Mettre 100 ml, agiter le gel pendant 10 min
Sensibilisation	Ethanol 30 ml Sensitizer 10 ml Eau 60 ml	Mettre 100 ml, agiter le gel pendant 10 min
Premier lavage	Ethanol 30 ml Eau 70 ml	Mettre 100 ml, agiter le gel pendant 10 min
Second lavage	Eau 100 ml	Mettre 100 ml, agiter le gel pendant 10 min
Coloration	Stainer 1 ml	Mettre 100 ml, agiter le gel pendant 15 min

	Eau 99 ml	min
Lavage	Eau 100 ml	Mettre 100 ml, agiter le gel pendant 1 min
Développer	Développer 10 ml Eau 90 ml Ajouter une goutte d'enhancer	Mettre 100 ml, agiter le gel pendant 4-8 min
Stopper	Stopper 10 ml Ajouter directement à la solution	Mettre 10 ml, agiter le gel pendant 10 min
Lavage	Eau 100 ml	Mettre 100 ml, agiter le gel pendant 10 min

#### **Avantage et inconvénient**

Les bandes sont visibles à l'œil, la détermination de la masse moléculaire est facile. En calibrant avec des protéines de références dont les masses moléculaires sont connues. On peut déterminer la masse moléculaire.

#### **Conclusion**

Lors que les bandes sont bien visibles et bien séparées le gel était considéré bon.

### **9.3-Dosage de la réponse immunitaire aux extraits salivaires de *P. duboscqi* par ELISA**

#### **Principe**

Le test immuno-enzymatique (ELISA) est basé sur la technique sandwich. Les puits sont sensibilisés avec les protéines salivaires. Les anticorps spécifiques, contenus dans l'échantillon et se liant aux protéines fixés aux puits, sont détectés par un second anticorps conjugué à une enzyme (E-Ab) et spécifique aux IgG humaines.

Suite à la réaction substrat, l'intensité de la couleur développée est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques IgG. **Matériel et réactifs.**

- TCB pH 9,6 (0.795g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 1.465g NaHCO<sub>3</sub>; 500ml H<sub>2</sub>O)
- TBS+BSA 4% (0.05M Tris ; 0.138M NaCl ; 0.0027M KCl ; 4g BSA)
- TBS 0,005% Tween 20 (0.05M Tris; 0.138M NaCl; 0.0027M KCl; Tween 20).
- Second anticorps conjugué à l'alcaline phosphatase (Anticorps chèvre anti IgG-humain) (Sigma, MO).
- Substrat : pNPP [p-nitrophenyl phosphate liquide (Sigma, MO)].
- Micropipettes (Multipette Eppendorf ou appareils similaires). Volumes: 5; 50; 100; 500 µL.
- Plaque d'ELISA (Immulon 4HBX).
- Micropipette à 8 canaux avec réservoirs pour réactif.
- Bouteille de lavage, système de lavage de microplaques automatisé ou semi-automatisé.
- Lecteur de microplaque capable de lire l'absorbance à 405 nm
- Eau déminéralisée.
- Serviettes en papier, embouts de pipette et chronomètre.

### **Procédure**

- Diluer le plasma 1 :50 dans le TBS/BSA 4%.
- Sensibiliser la plaque (la veille) en déposant 50µl/puits de l'homogénat de la glande salivaire (*P.duboscqi*, *Ano.gambiae* ou *Culex quinquefasciatus*) dilué à 2 paires/ml dans le tampon de carbonate bicarbonate à pH 9.6 (TCB).
- Couvrir la plaque avec de film plastic et mettre à +4°C avant l'utilisation.
- Saturation des sites de fixation non spécifiques : Enlever la solution, bloquer les antigènes non spécifiques avec 200µl TBS+BSA 4%/ puits. Mettre à la température ambiante pendant une heure, enveloppé dans de film plastic.
- Rincer la plaque 3 fois avec TBS 0.05% tween.
- Sérums : Ajouter 50µl de sérum dilué en TBS/BSA 4% 1: 50 et mettre à 37°C pendant 1heure, enveloppé dans de film plastic.
- Rincer la plaque 3 fois avec TBS 0.05% tween.
- Conjugué : Incuber avec 50µl l'Anticorps secondaire dilué au 1:1000 TBS/BSA 4% [anticorps Chèvre anti IgG humains couplés à la phosphatase alcaline

(Sigma, MO)] et mettre à la température ambiante pendant une heure, enveloppée dans de film plastic.

- Rincer la plaque 6 fois avec TBS 0.05% tween.
- Révélation : Révéler avec 100µl /puits de la solution de révélation de p – NitroPhenyl Phosphate (pNPP) [Sigma, MO], substrats de la phosphatase alcaline (Doit être utilisé à température ambiante avant l'utilisation).
- Lecture à 405nm.

### **Résultats et interprétation**

- Enregistrer la densité optique dans chaque puits à et calculer la moyenne des valeurs triplicatas de chaque échantillon.
- Pour chaque échantillon, les triples ne devront pas diverger de plus de 15% de la valeur de la moyenne. Si la divergence est supérieure, le dosage devra être répété.

### **Avantages et inconvénients**

On n'a pas besoin de purifier la protéine pour la doser

L'utilisateur doit être entraîné et familiarisé avec les dosages ELISA et les procédures de test.

Nécessite des anticorps spécifiques

Un peu lourd à mettre en place

Utiliser un nouveau film plastic pour chaque étape d'incubation/fixation de l'ELISA afin d'éviter une contamination croisée

Utiliser des embouts de pipettes à usage unique pour chaque transfert afin d'éviter une contamination croisée.

Les bouchons et les flacons ne sont pas interchangeables. Les bouchons doivent être replacés sur les flacons correspondants

### **Conclusion**

La moyenne de la densité optique des triplicatas on été retenue pour chaque échantillons.

#### **9.4- Détermination de la spécificité de la réponse immunitaire des extraits salivaires de *P. duboscqi***

Le protocole était le même que celui du dosage de la réponse immunitaire aux extraits salivaires de *P. duboscqi* par ELISA ([annexe 9.3](#)) à la différence nous avons utilisé sérum pré-incubé et le sérum frais.

#### **9.5- Analyse de réaction croisée par la technique de Western blot**

##### **Principe**

Cette technique nécessite de réaliser d'abord une électrophorèse sur le gel NuPAGE. Les protéines sont alors transférées sur une feuille de nitrocellulose. Puis les antigènes sont révélés par une technique immuno-enzymatique.

##### **Matériel**

- NuPage 4-12% Bis Tris Gel 1.0 mm \* 10 puits.
- Tampon de l'échantillon NuPage LDS (4X).
- Marqueur de poids moléculaire (SeeBlue®Plus®).
- Tampon de migration Tris Glycine 10X avec SDS ~50 ml dans 500 ml d'eau déminéralisée =1X.
- Le kit de transfert de protéine sur la membrane nitrocellulose (iBlot™ Dry Blotting System).
- TBS: Tris buffered saline.
- TBST: Tris buffered saline avec Tween20.
- Tampon de blocage: TBST avec 5% de lait.
- Tampon de transfert : Tris glycine SDS.

##### **Procédure**

- Préparer les aliquotes d'échantillons maximum 200 µl.
- Ajouter l'équivalent de 1X SDS protéine.
- Mettre les échantillons à 80°C pendant 2min.
- Préparer le gel, enlevé l'emballage et placer dans la cuve un ou deux gels.
- Remplir la cuve avec 1X de tampon de migration (Tris/Glycine/SDS).
- Loger les échantillons et faire migrer 1 :30 min à 200 volts.

- Enlever le plastique de protection du gel et mettre le gel dans une boîte pétrie.
- Transfert des protéines sur la membrane nitrocellulose (iBlot™ Dry Blotting System).
- Bloquer la membrane avec dans du TBS-lait 5% à 4°C pendant une nuit sous l'agitation continue.
- Laver la membrane 3 fois avec du TBS Tween20.
- Incuber avec l'anticorps primaire dilué à 1/ 50 (sérum) sous l'agitation continue pendant 2 heures à la température ambiante. [dans notre cas nous avons utilisé le sérum pré-incubé et le sérum frais]
- Laver la membrane 3 fois 5min avec du TBS Tween20 sous l'agitation continue.
- Ajouter 30ml de l'anticorps secondaire dilué au 1:1000 TBS/BSA 4% [anticorps Chèvre anti IgG humains couplés à la phosphatase alcaline (Sigma, MO)] sous l'agitation continue pendant une heure.
- Laver la membrane 5 fois 15min avec du TBS Tween20 sous l'agitation continue.
- Révéler les bandes avec du substrat de l'alcaline phosphate sous l'agitation. Le développement de la coloration est arrêté avec de l'H<sub>2</sub>O déminéralisée.

### **Résultats et interprétations**

L'interprétation consistait à identifier les bandes, faire une comparaison de la taille et l'intensité des bandes.

### **Avantage et inconvénient**

Le western blot permet de détecter, de doser et de caractériser facilement une protéine, parmi des milliers d'autres. Il nécessite un outillage coûteux.

### **Conclusion**

Toutes les bandes révélées sur la membrane nitrocellulose ont été tenues en compte.

**FICHE SIGNALETIQUE****Français****Nom:** TRAORE**Prénom:** Bourama**Section:** Pharmacie**Titre:** Etude de la réponse immunitaire aux extraits salivaires de *Phlebotomus duboscqi* dans la commune rurale de Baraouéli.**Année :** 2009-2010**Pays:** Mali**Lieu de dépôt:** bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS).**E-mail :** [bosstrao@yahoo.fr](mailto:bosstrao@yahoo.fr); [bouramat@icermali.org](mailto:bouramat@icermali.org)**Secteur d'intérêt:** Immunologie, Bioinformatique, Biologie moléculaire.**Résumé**

Au cours de cette étude transversale conduite à Sougoula et à Kéména nous avons étudié la spécificité de l'anticorps anti-salivaires des extraits salivaires de *P. duboscqi*. Les sujets de cette étude étaient âgés de 2 à 92 ans (n=117).

Ces individus vivants dans ces deux localités produisaient l'anticorps IgG contre les extraits salivaire de *P. duboscqi*, d'*An. gambiae* et de *Culex quinquifasciatus*.

Les deux villages présentaient le même niveau d'exposition à la piqûre de *P. duboscqi* ceci était pareil entre les deux sexes. Il n'existait pas de corrélation entre l'évolution de l'âge et l'anticorps IgG anti-salive *P. duboscqi*.

L'anticorps IgG du sérum pré-incubé contre les protéines salivaires de *P. duboscqi* diminuait chez certains individus, pendant qu'elle était augmentée

chez d'autres. Nous avons également constaté qu'elle restait similaire chez certaines personnes.

Le résultat de Western blot montre qu'il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre l'immunoempreinte d'*An. gambiae* de sérum pré-incubé et de sérum frais. Ce constat était pareil pour l'immunoempreinte de *Culex quinquefasciatus* observé. Par ailleurs, l'intensité des bandes de l'immunoempreinte de *P. duboscqi* de sérum pré-incubé semble diminuer en le comparant à la bande de sérum frais.

**Mots clés :** Spécificité, Anticorps, *P. duboscqi*, Barouéli, Mali.

## English

**Name:** TRAORE

**First name:** Bourama

**Section:** Pharmacy

**Title:** Study of immunity answer to the gland salivary extraction of *Phlebotomus duboscqi* in the rural community of Barouéli.

**Year:** 2009-2010

**Country:** Mali

**Discharge point:** Library of faculty of medicine, pharmacy and odonto stomatology

**E-mail:** [bosstrao@yahoo.fr](mailto:bosstrao@yahoo.fr); [bouramat@icermali.org](mailto:bouramat@icermali.org)

**Sector of interest:** Immunology, Bio-informatics, molecular Biology.

## Summary

**Keys words:** Specificity, Antibody, *P. duboscqi*, Barouéli, Mali.

## **SERMENT DE GALIEN**

En présence des maîtres de cette Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes chers condisciples, devant l'effigie de Galien, je promets et je jure, au nom de l'être suprême:

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer dans l'intérêt de la santé publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
- Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.
- Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Je le jure !**

---