


|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |

| REDACTEURS        | VERIFICATEURS                        | APPROBATEUR                         | DESTINATAIRES                 |
|-------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Franck REMOUE     | Christophe ROGIER<br>Thomas KESTEMAN | Participants au projet<br>PALEVALUT | Biologistes<br>Immunologistes |
| Date : 19/08/2013 | Date : 26/08/2013                    | Date : 04/10/2016                   | Techniciens de laboratoire    |

**Objet :** La procédure définit la méthode d'évaluation du niveau d'exposition des individus aux piqûres des moustiques *Anopheles*, vecteur du paludisme, par la mesure quantitative (ELISA) des réponses anticorps IgG spécifique à un peptide salivaire spécifique d'*Anopheles* (peptide gSG6-P1). Ce biomarqueur salivaire sérologique permet d'évaluer l'efficacité de la lutte antivectorielle sur le contact homme-vecteur, en conditions réelle d'utilisation (effectiveness).


**Application :** Le document est élaboré pour le personnel chargé de l'évaluation immunologique du contact homme-vecteur (Biologiste, immunologistes, techniciens de laboratoire), évaluation qui est intégrée aux études épidémiologiques.

**Documents associés :**

- POS n°5 ; PREVALENCE : Prévalence du paludisme, des interventions de contrôle et de leurs facteurs associés ;
- POS n°6 ; EFFECTIVENESS-INFECTION : Efficacité des mesures de lutte antipaludique sur les infections plasmodiales ;
- POS n° 9 BLOOD-SAMPLING : Prélèvements sanguins pour analyses biologiques.

**Annexe : Néant**



|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |


## Historique des modifications :

| Date       | Version | Nature de la modification   |
|------------|---------|---|
| 19/08/2013 | 1       | Création de la POS  |
| 26/08/2013 | 2       | Corrections par les vérificateurs   |
| 30/09/2013 | 3       | Corrections après les remarques des participants à l'atelier WP1  |
| 04/10/2016 | 4       | Prise en compte des remarques des responsables de la mise en œuvre de la POS (Madagascar, Bénin, Cameroun et Côte d'Ivoire) et insertion des propositions faites lors de l'atelier WP4 (3 au 7 octobre 2016, Paris) |
| 28/10/2016 | 5       | Remise en forme selon modèle défini   |
| 01/02/2018 | 6       | Validation par C. Rogier  |

## Sommaire :

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 1   | Introduction .....                          | 3  |
| 2   | Objectifs .....                             | 5  |
| 3   | Responsabilités .....                       | 5  |
| 4   | Matériels .....                             | 5  |
| 4.1 | Equipement de laboratoire .....             | 5  |
| 4.2 | Consommables de laboratoire .....           | 6  |
| 4.3 | Réactifs .....                              | 6  |
| 5   | Méthodes .....                              | 7  |
| 5.1 | Préparation des sérums ou éluats .....      | 7  |
| 5.2 | ELISA .....                                 | 7  |
| 5.3 | Méthodologie d'analyses des résultats ..... | 10 |
| 6   | Références .....                            | 11 |



|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |

La POS IMMUNO-VECTOR-BITES a été validée pour sa méthodologie technique (protocole ELISA). **La méthodologie d'analyse des résultats pour l'évaluation de l'efficacité de la lutte anti-vectorielle par la mesure immunologique du contact homme-vecteur, en conditions réelle d'utilisation (effectiveness) n'a pas encore été validée.**


## 1 Introduction

Le but des méthodes de lutte anti-vectorielle est de diminuer la morbidité/mortalité due au paludisme en empêchant le contact entre les individus exposés et les moustiques *Anopheles* transmettant les plasmodiums. Elles visent à réduire le contact homme-vecteur et la proportion des vecteurs transmettant des plasmodiums. Les méthodes entomologiques actuelles ne permettent pas d'évaluer, de manière directe et à un niveau individuel, le niveau du contact homme-vecteur. Cette évaluation nécessite le développement de nouvelles techniques. Des indicateurs immuno-épidémiologiques, plus sensibles, plus simples et rapides à utiliser et qui mesurent réellement et individuellement le degré d'exposition des populations humaines aux piqûres d'*Anopheles* (contact homme-vecteur) peuvent permettre d'évaluer le contact homme-vecteur au niveau individuel, et donc d'évaluer l'efficacité opérationnelle des méthodes de lutte anti-vectorielle. Des études immunologiques et moléculaires ont permis d'identifier un nouveau biomarqueur immunologique mesurant le contact homme-vecteur (Poinsignon *et al.*, 2008 ; Drame *et al.*, 2013). Ce biomarqueur est basé sur l'évaluation, chez l'homme exposé aux piqûres des vecteurs, des réponses anticorps IgG spécifiques de protéines/peptides de la salive des *Anopheles*. L'intensité de cette réponse anticorps « anti-salive » (*i.e.* reconnaissant des antigènes salivaires) est proportionnelle aux nombres de piqûres (infectantes ou non infectantes) reçues par les individus exposés (Remoue *et al.*, 2006). Ce biomarqueur salivaire permet, par l'évaluation qualitative (présence/absence) et quantitative (intensité) de la réponse anticorps spécifique d'antigènes salivaires des vecteurs, d'identifier les personnes exposées aux piqûres des vecteurs et de mesurer leur niveau d'exposition à ces vecteurs. Parmi toutes les protéines salivaires spécifiques des *Anopheles*, un peptide salivaire spécifique (peptide gSG6-P1 de la protéine gSG6 de *Anopheles*) a été identifié et a été montré que les réponses IgG spécifiques du peptide gSG6-P1 sont des biomarqueurs de l'exposition de l'homme aux piqûres de *An. gambiae* et *An. funestus* (Poinsignon *et al.*, 2008, 2009, 2010 ; Badu *et al.*, 2012 ; Sagna *et al.*, 2013). La réponse IgG reconnaissant le peptide gSG6-P1, est plus particulièrement un biomarqueur d'une faible, voir très faible, exposition aux vecteurs du genre *Anopheles*, conditions où les méthodes entomologiques manquent de sensibilité pour évaluer l'exposition aux piqûres (Poinsignon *et al.*, 2009 ; Sagna *et al.*, 2013). Il a été démontré que les réponses IgG spécifiques de la salive totale de *Anopheles* ou du peptide salivaire gSG6-P1 étaient également des biomarqueurs individuels de l'efficacité des méthodes de lutte anti-vectorielle comme les

3/12

Cette oeuvre, création, site ou texte est sous licence Creative Commons Attribution - Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International. Pour accéder à une copie de cette licence, merci de vous rendre à l'adresse suivante <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/> ou envoyez un courrier à Creative Commons, 444 Castro Street, Suite 900, Mountain View, California, 94041, USA.




|   |   |                            |
|---|---|----------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b> |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> | Version : 6                               | Date : 01/02/2018          |

moustiquaires imprégnées d'insecticides associées ou non à d'autres méthodes (Corbel *et al.*, 2013), permettant de comparer entre elles l'efficacité de différentes méthodes de lutte (Drame *et al.*, 2010a et 2010b, Brosseau *et al.*, 2012). Enfin, la réponse anticorps contre le peptide gSG6-P1 permet une évaluation de l'utilisation efficace des moustiquaires imprégnées corrélée à celle effectuée avec des questionnaires standardisés (Drame *et al.*, 2013), évaluation sensible aux variations de l'intégrité physique des moustiquaires imprégnées (corrélation entre niveau de la réponse IgG spécifique et le Hole Index, i.e. index de trous, des moustiquaires ; Noukpo *et al.*, 2016).

La méthodologie proposée ci-dessous permet de quantifier le niveau d'exposition des individus aux piqûres (infectantes et non infectantes) des *Anopheles* vecteurs, l'efficacité opérationnelle et l'utilisation des (*i.e.* exposition aux) méthodes de lutte anti-vectorielle (moustiquaires imprégnées d'insecticides, aspersions intra-domiciliaires d'insecticides, etc.), quelque soit le niveau d'agressivité des vecteurs (*i.e.* aussi bien en zone de faible, moyenne ou fort niveau d'exposition des individus aux piqûres). Elle repose sur l'évaluation par ELISA des réponses anticorps IgG anti-peptide gSG6-P1 et est réalisable à partir de i) sérum collecté à partir d'une Microcuvette à gel séparateur, ii) sérum collecté à partir d'un prélèvement de sang veineux ou iii) de sang capillaire collecté sur un papier-buvard (voir POS n°9 ; BLOOD SAMPLING). Cette méthodologie s'intègre aux évaluations épidémiologiques de l'étude concernant l'utilisation des stratégies de lutte anti-vectorielle (POS n°5 PREVALENCE) et leur efficacité sur le contact homme-vecteur, en conditions réelles d'utilisation. Les résultats immunologiques peuvent être associés à ceux de la POS « Entomologie » n°19 VECTOR-CONTROL-QUALITY (cf. indicateur Hox Index des moustiquaires) pour le contrôle de l'intégrité des moustiquaires.

Cette procédure décrit ici uniquement le dosage ELISA des réponses anticorps IgG spécifique au peptide salivaire gSG6-P1 au laboratoire.



|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |

## 2 Objectifs

Les objectifs poursuivis par l'utilisation de cette procédure sont :

- 1) Evaluer l'efficacité (effectiveness) des interventions de lutte anti-vectorielle déployées (moustiquaires imprégnées d'insecticides et/ou aspersion intra-domiciliaire d'insecticides) sur le contact homme-vecteur estimé par les réponses IgG dirigées contre un antigène salivaire d'anophèle.
- 2) Evaluer l'effet de l'intégrité physique des moustiquaires mesuré par le Hole Index (Indices de trous des moustiquaires ; intégration à la POS VECTOR-CONTROL-QUALITY) sur l'efficacité de la protection antivectorielle des moustiquaires.

## 3 Responsabilités

**Biologistes/immunologistes** : Supervision de la POS et des dosages ELISA des réponses IgG anti-gSG6-P1. Responsables de la validité des résultats immunologiques et de leurs analyses en fonction des objectifs de la POS.

**Techniciens (ou ingénieur) de laboratoire** : responsable du stockage des sérums en sérothèque (-20°C), dosage ELISA des réponses IgG anti-gSG6-P1.

## 4 Matériels

Cette procédure se décompose en une seule étape au laboratoire : l'évaluation ELISA des réponses anticorps IgG spécifiques du peptide salivaire gSG6-P1, à partir de prélèvements de sang (voir POS n°9 BLOOD-SAMPLING). Cette procédure s'applique quel que soit la nature du sang prélevé (capillaire, veineux) ou la méthode utilisée pour effectuer et conserver le prélèvement.


### 4.1 Equipement de laboratoire

- 1 Lecteur spectrophotomètre ELISA de plaques 96 puits - filtre = 405 nm
- 1 Etuve sèche à 37°C
- 1 Ph-mètre
- 1 bloc chauffant avec agitation

5/12

Cette oeuvre, création, site ou texte est sous licence Creative Commons Attribution - Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International. Pour accéder à une copie de cette licence, merci de vous rendre à l'adresse suivante <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/> ou envoyez un courrier à Creative Commons, 444 Castro Street, Suite 900, Mountain View, California, 94041, USA.



|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |

- 1 agitateur Vortex
- 1 ordinateur relié au lecteur ELISA et logiciel de gestion et d'analyse des données ELISA
- Equipement pour obtention d'eau déminéralisée ou « ultra-pure » (type milli-Q™)
- Micropipettes de 0,5-10 ; 20-200 µl et 100-1000 µl
- Micropipette multi-canaux de 20-300 µl
- Pipeteur automatique de type Pipet-Boy
- Portoirs pour tubes Eppendorf de 1,5 ml
- Boîtes cartonnées de rangement pour 100 tubes Eppendorf de 1,5 ml


#### 4.2 Consommables de laboratoire

- Plaques NUNC de 96 puits - Fond Plat « MAXISORP »
- Micro-tubes plastiques de 1,5 ml PP avec cupule (de type Eppendorf)
- Barreaux aimantés
- Récipients/bécher (verrerie) de 100, 250, 500 et 1000 ml
- Tubes « rhésus » de 1,5 ml
- Tubes plastiques avec bouchon de 10, 20 et 50 ml
- Réservoir plastique de 300 ml
- Pipettes plastiques de 5 et 10 ml
- Eprouvettes de 10, 50, 100 et 250 ml
- Cônes-pointes pour micro-pipettes de 0,5-10 ; 20-200 µl et 100-1000 µl
- Portoir 96 puits pour tube « rhésus » de 1,5 ml
- Papier absorbant de laboratoire (de type Sopalin)
- Papier aluminium

#### 4.3 Réactifs

- Composés chimiques pour préparation des tampons : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, Acide citrique, NaOH
- Tween 20
- Pastilles de 50 x 10 mg d'ABTS « 2,2'-azino-di [3-ethyl-benzthiazoline 6-sulfonate] » - ABTS (Société : PerboSciences (Thermo Scientific) - ref : 34026)
- Streptavidine-HRP conjuguée (Streptavidine - Peroxydase) (Société : Dutscher SAS - ref : RPN1231 -2 ML)
- Ac anti-IgG humaines, couplé à la biotine = Anti-Human IgG - Biotin 0.5 mg (Société : BD-Biosciences - ref : 555785)
- Pierce Protein-Free (TBS) Blocking Buffer, 1 Litre (Société : PerboSciences (Thermo Scientific) - ref : 37570)



|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% (Société: Sigma - ref: H1009).
- Peptides salivaire gSG6-P1 – Pureté HPLC >95% - Société Genepep, Montpellier, France (= peptide GPS1216) - Séquence : H-EKVVVDRDNVYCGHLDCTRVATF-OH
- Un pool de sérums positifs et un pool de sérums négatifs utilisés comme témoins positifs et négatifs des ELISA, pools identiques pour l'ensemble de l'étude, afin de permettre des comparaisons entre plaques.

## 5 Méthodes

Cette procédure ne comprend qu'une seule étape

### 5.1 Préparation des sérums ou éluats

La procédure d'obtention des sérums par l'utilisation de Microcuvettes à gel séparateur, à partir de sang prélevé sur tube sec ou à la seringue, ou d'obtention d'éluat à partir de collecte de sang sur papier-buvard 3MM est décrite dans la POS BLOOD-SAMPLING. Le sérum ou l'éluat est placé dans un microtube 1,5 ml PP de type eppendorf.

### 5.2 ELISA

#### Définitions :

- . ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay): technique utilisée pour détecter des anticorps au moyen d'anticorps secondaires conjugués à un système d'amplification ou à une enzyme (peroxydase, phosphatase)
- . SP (Streptavidine-Peroxydase) : complexe enzymatique qui se fixe sur l'anticorps secondaire biotinylé et dont l'activité enzymatique peroxydase est révélée par l'ABTS.
- . ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium : substrat de la Peroxydase.


#### Resuspension du peptide gSG6-P1

Solvant : eau déminéralisée ou purifiée (type milli-Q™) ; Concentration finale : 1 mg/ml

- Ajouter l'eau dans le flacon commercial (1 ml par mg de peptide) contenant le peptide (livré sous forme lyophilisée)
- Vortexer doucement le tube jusqu'à la dissolution complète du peptide
- Prélever un certain volume (environ 1ml) de la solution du tube et la verser dans le flacon qui contenait le peptide lyophilisé pour en récupérer les résidus. Vortexer doucement le flacon puis re-transférer la solution dans le tube.

7/12



|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |

- Vortexer à nouveau le tube
- Faire des aliquots de 1 ml et les congeler à -20°C.

#### Sensibilisation (Coating) des puits des plaques avec le peptide salivaire gSG6-P1

- Diluer la solution de peptide à 20 µg/ml en Tampon PBS
- Verser la solution diluée de peptide, *i.e.* solution « de coating », dans un réservoir de 50 ml
- Déposer 100µL de la solution de coating par puits de la Plaques NUNC-MAXISORP 96 puits, en utilisant Micro-pipette multi-canaux de 20 -300 µl

*Pour chaque échantillon (sérum ou éluat) à analyser, prévoir des duplicats de puits avec peptide (« Ag+ ») et sans peptide (« Ag- »), c'est-à-dire ayant été seulement rempli de tampon PBS.*

- Incuber les plaques à l'étuve sèche 37°C pendant 2h30mn.
- Laver 3 fois les plaques avec de l'eau - tween à 0,1%

#### Saturation des puits

- Verser la solution de saturation (TBS Blocking Buffer) dans un réservoir de 50 ml
- Déposer 300 µl de Blocking Buffer par puits des plaques en utilisant une Micro-pipette multi-canaux
- Incuber les plaques 1h à T° ambiante
- Laver 3 fois les plaques avec de l'eau - tween à 0,1%

#### Incubation des Sérums ou éluats


(Dilution à préparer dans les 2h30mn de la phase de sensibilisation)

*-NB.1 : Sur chaque plaque, utiliser un pool positif et un pool négatif comme témoins positifs et négatifs*

*NB.2 : Sur une plaque ELISA indépendante, une seule fois pour l'ensemble de l'étude, analyser les sérums (ou éluats) d'un minimum de 10 témoins négatifs (individus non exposés aux piqûres d'Anopheles, *i.e.* individus européens par exemple – idéalement 30 témoins) afin d'établir un seuil de positivité (« seuil de répondeur ») pour la réponse IgG anti-gSG6-P1. Ce seuil est calculé par la formule :  $\Delta DO$  moyenne des témoins négatifs + 3x écart-types (ET). Le sérum (ou éluat) d'un individu est déclaré « positif ou répondeur » si la  $\Delta DO$  observée est supérieur à ce seuil.*





|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |

- Diluer les sérums ou éluats en PBS-Tween 1% pour une dilution finale au 1/40 (dilution dans tube « rhésus »)
- Déposer 100 µL de sérum/éluat dilué par puits en utilisant une Micro-pipette multi-canaux de 20 -300 µl
- Incuber à 4°C pendant une nuit (e.g. 12 heures).
- Laver 5 fois les plaques avec de l'eau - tween à 0,1%

#### Dépôt de l'Ac anti-IgG humain biotinylé (= Ac secondaire)

- Diluer l'Ac secondaire en tampon PBS-Tween 1% à une dilution finale de 1/2000
- Verser la solution « Ac secondaire » dans un réservoir de 50 ml
- Déposer 100 µL de solution par puits en utilisant une Micro-pipette multi-canaux
- Incuber à l'étuve 37°C pendant 1h30mn
- Laver 5 fois les plaques avec de l'eau - tween à 0,1%

#### Dépôt de la Streptavidine/peoxydase (SP) = amplification

- Diluer la SP en tampon PBS-Tween 1% à une dilution finale de 1/2000
- Verser la « solution SB » dans un réservoir de 50 ml
- Déposer 100 µL de solution par puits en utilisant une Micro-pipette multi-canaux
- Incuber à l'étuve 37°C pendant 1h
- Laver 6 fois les plaques avec de l'eau - tween à 0,1%

#### Révélation : ABTS


- Préparer la solution ABTS 30 min avant dépôt - Pour une plaque : 10 mg ABTS (tablettes) + 10ml tampon Citrate 0,05M + 10 µlH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (à rajouter juste avant dépôt).
- Verser la « solution ABTS » dans un réservoir de 50 ml
- Déposer 100 µL de solution par puits en utilisant une Micro-pipette multi-canaux

#### Lecture au spectromètre (Lecteur ELISA – plaques 96 puits)

Lectures à 1h, 2h et 4h à 405 nm.

#### Enregistrement des résultats :



|   |   |                            |
|---|---|----------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b> |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> | Version : 6                               | Date : 01/02/2018          |

Les résultats issus du spectromètre peuvent être lus par un logiciel ELISA relié au spectrophotomètre puis enregistrés dans un formulaire de saisie. Ces résultats individuels sont, par la suite, enregistrés dans un fichier excell pour le calcul des résultats des DO brutes.

### 5.3 Méthodologie d'analyses des résultats

La méthodologie d'analyses des résultats n'a pas encore été standardisée.

Une première approche est proposée ci-dessous.


Les calculs sont effectués sur les  $\Delta DO$ , c'est-à-dire la valeur moyenne des DO observée pour un échantillon dans les deux puits sensibilisés avec le peptide gSG6-P1 déduit de la valeur de la DO observée avec le même échantillon dans un puit non sensibilisé avec ce peptide. Pour la suite des calculs, il peut être nécessaire de transformer les valeurs de  $\Delta DO$  pour normaliser leur distribution chez les individus non exposés aux piqûres d'anophèles (témoins négatifs). Plusieurs transformations peuvent être envisagées : transformation logarithmique, les transformations Box-Cox (Package R: <https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/MASS/html/boxcox.html>) ou de Johnson (Package R: <https://cran.r-project.org/web/packages/Johnson/index.html>), etc...

Le seuil de positivité est défini sur la base des estimations des  $\Delta DO$  d'une trentaine (idéalement) de témoins négatifs, si nécessaire après une transformation pour en normaliser la distribution : moyenne des  $\Delta DO^*$  + 3,09 écarts-types (ET). ( $\Delta DO^*$  :  $\Delta DO$  si nécessaire transformée pour normalisation)

En première approche, la proportion d'individus déclarés positifs (*i.e.* avec une  $\Delta DO^* >$  seuil de positivité) est comparée selon l'exposition aux mesures de lutte antipaludique telles qu'elle est mesurée dans la POS n°5 PREVALENCE. L'association entre cette réponse anticorps spécifique et l'exposition à chacune des mesures de lutte est mesurée par un rapport des cotes (odds-ratio, OR). Si l'OR est inférieur à 1, la mesure est protectrice. L'efficacité protectrice conférée par chacune des mesures contre le fait d'être positif est estimée par  $EP=1-OR$ . Les analyses sont menées comme indiqué dans la POS n°6 EFFECTIVENESS-INFECTIION.

Si la proportion d'individus positifs est trop importante, il est possible de considérer les individus dont le ratio [ $\Delta DO^*$  de l'individu / seuil de positivité] est supérieur à un niveau choisi de façon appropriée, par exemple la valeur médiane de ce ratio chez les individus étudiés. Les individus répondant à cette définition sont considérés comme des individus à « positivité élevée ». L'OR calculé à partir de cette définition d'une « positivité élevée » permet de calculer de la même manière que précédemment l'efficacité protectrice conférée par chacune des mesures contre le fait d'être « hautement positif » en IgG anti-gSG6-P1.



|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |

En analyse exploratoire, il est enfin possible de considérer les valeurs de  $\Delta DO^*$  comme variable dépendante (*i.e.* « à expliquer ») dans des modèles où les mesures de lutte sont des variables indépendantes (*i.e.* explicatives ou à contrôler).

## 6 Références

Badu K, Siangla J, Larbi J, Lawson BW, Afrane Y, Ongecha M, Remoue F, Zhou G, Githeko AK, Yan G. Variation in exposure to *Anopheles gambiae* salivary gland peptide (gSG6-P1) across different malaria transmission settings in the western Kenya highlands. *Malaria J.* 2012, 11:318 doi:10.1186/1475-2875-11-318.

Brosseau L, Besnard P, Drame PM, Toto JC, Foumane V, Le Mire J, Mouchet F, Remoue F, Richard A, Fortes F, Carnevale P, Manguin S. Human antibody response to *Anopheles* saliva for comparing the efficacy of three malaria vector control methods in Balombo, Angola. *PLoS ONE.* 2012. 7:9- e44189.

Corbel V, Remoue F, Rogier C. Combining vector control interventions for malaria prevention: from theoretical synergism to practical antagonism *The Lancet Infectious Diseases.* 2013. 13 (2), p. 112-113. Correspondance.


Drame PM., Poinsignon A., Besnard P., Le Mire J., Dos-Santos MA. Sow CS., Doucoure S., N'Diaye A., Cornélie S., Foumane V., Toto JC., Sembene M., Boulanger D., Simondon F., Fortes F., Carnevale P. and Remoue F. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: a new immuno-epidemiological marker to evaluate the efficacy malaria anti-vector strategies based on the use of Insecticide Treated Nets. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010a. 83:115-121

Drame PM., Poinsignon A., Besnard P., Cornélie S., Le Mire J., Toto JC., Foumane V., Dos-Santos MA., Sembene M., Fortes F., Simondon F., Carnevale P. and Remoue F. Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of Insecticide Treated Nets in malaria vector control. *Plos ONE.* 2010b. 5:12-e15596.

Drame PM, Poinsignon A, Marie A, Noukpo H, Doucoure S, Cornélie S, Remoue F. New salivary biomarkers of human exposure to malaria vector bites. Book Chapter 23, *In Anopheles mosquitoes- New insights into malaria vectors*, Manguin S. (Ed.). 2013. InTech open access Publisher, Rijeka, Croatia, ISBN 980-953-307-550-6 (Chapter 23, pp 755-795).

Drame PM, Diallo A, Poinsignon A, Boussari O, Dos Santos S, Machault V, Lalou R, LeHesran JY, Remoue F. Evaluation of the effectiveness of malaria vector control measures in urban settings of Dakar by a specific *Anopheles* salivary biomarker. *Plos ONE.* 2013. 8(6):e66354. doi: 10.1371



|   |   |                                  |
|---|---|----------------------------------|
|    | <b>Procédure Opératoire Standard n°13</b> | <b>IMMUNO-VECTOR-BITES</b>       |
| <b>Evaluation immunologique de l'exposition aux piqûres des vecteurs du paludisme</b><br><i>Immunological evaluation of exposure to malaria vectors</i> |   | Version : 6<br>Date : 01/02/2018 |

Noukpo MH, Damien G.B., Elanga N'Dille E, Sagna AB. Drame PM, Chaffa E, Boussari O, Corbel V, Akogbeto M, Remoue F. Operational assessment of Long-Lasting Insecticidal Nets by using an *Anopheles* salivary biomarker of human-vector contact. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2016. *In press*

Poinsignon A., Cornelie S., Mestres-Simon M., Lanfrancotti A., Rossignol M., Boulanger D., Cisse B., Sokhna C., Arca B., Simondon F. and Remoue F. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *Plos ONE.* 2008. 3:e2472.

Poinsignon A., Cornelie S., Ba F., Boulanger D., Sow C., Rossignol M., Sokhna C., Cisse B., Simondon F. and Remoue F. Human IgG response specific to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low level of exposure to *Anopheles* bites. *Malaria Journal.* 2009. 8:198

Poinsignon A, Samb B, Doucoure S, Drame PM, Sarr JB, Sow C, Cornelie S, Maiga S, Thiam C, Rogerie F, Guindo S, Hermann E, Simondon F, Dia I, Riveau G, Konate L and Remoue F. A First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *An. funestus* bites. *Trop. Med. Intern. Health.* 2010. 15 :1198-1203

Remoue F., Cissé B., Ba F., Sokhna C., Hervé JP., Boulanger D. and Simondon F. Evaluation of antibody responses to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria? *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006; 100:363-370.

Sagna AB, Sarr JB, Lobna Gaayeb L, Drame PM, NDiath MO, Senghor S, Cheikh Sow C, Poinsignon A, Seck M, Schacht AM, Faye N, Sokhna C, Remoue F, Riveau G. gSG6-P1 salivary biomarker discriminates micro-geographical heterogeneity of human exposure to *Anopheles* bites in low and seasonal malaria area. *Parasites and Vectors.* 2013. 6:68.

