

Liste des Abréviations

- AA:** Aminoacides
- A:** Adénine
- ADN:** Acide DesoxyriboNucleique
- ADNc:** Acide DesoxyriboNucleique complémentaire
- ARN:** AcideRiboNucleique
- ARNt:** AcideRiboNucleique de transfert
- C:** Cytosine
- Cseg:** Segmemt C
- CLHP:** Chromatographie Liquide Haute Performance
- EBA:** Erytrocyte Binding Antigen
- ELISA:** Enzym Linked ImmunoSorbent Assay
- EST:** Expressed Sequences Tags
- Fseg:** Segment F
- G:** Guanine
- GE:** Goutte Epaisse
- GO:** Gene Ontology
- GR:** globules rouges
- HbC:** Hémoglobine C
- HRP-2:** Histidin rich protein 2
- Hb S:** Hémoglobine S
- IgG:** Immunoglobulines G
- LDH:** Lacticodéshydrogénase
- Mb:** Méga base
- OMS:** Organisation Mondiale de la Santé
- PfRh:** Plasmodium falciparum reticulocyte binding protein homolog
- PIB:** produit intérieur brut
- Pb:** Paire de base
- QBC:** Quantitative Buffy Coat
- SP:** Sulfadoxine Pyrimetamine
- T:** Thymine
- TPI:** Traitement Présomptif Intermittent
- TVN :**Réseau Tubo-Vésiculaire .

Sommaire

Introduction.....	1
Rappels Bibliographiques.....	3
I. Epidémiologie.....	3
I.1. Agent pathogène.....	3
I.2. Vecteur.....	3
I.3. Mode de transmission.....	3
I.4. Cycle évolutif.....	3
I. 4.1 Le stade tissulaire ou la schizogonie hépatique.....	3
I. 4.2 Le stade sanguin ou schizogonie érythrocytaire.....	4
I. 4.3 La sporogonie.....	4
II. Invasion érythrocytaire.....	7
II. 1. Ultrastructure du merozoïte et processus d'invasion de l'érythrocyte.....	7
II. 2. Ultrastructure des stades intra-érythrocytaires et modifications structurelles de l'érythrocyte infecté.....	8
II.2.1. Compartiments intracellulaires du parasite et structures particulières.....	8
II.2.2. Modifications structurelles de l'érythrocyte par le parasite.....	9
II. 3. Mécanismes d'invasion des globules rouges.....	10
III. Le Génome.....	13
III. 1. Structure et composition.....	13
III. 2. Structure des chromosomes.....	14
III. 3. Les protéines.....	15
III. 4. Ploïdie génomique.....	16
III. 5. Mécanismes intervenant dans le polymorphisme.....	16

III. 6. Gène EBA-175.....	17
IV. Symptomatologie du paludisme à Plasmodium falciparum.....	18
IV. 1. L'accès « simple » à P. falciparum.....	18
IV. 2. L'accès pernicieux.....	19
IV. 3. Le paludisme viscéral évolutif à P. falciparum.....	20
IV. 4. La fièvre bilieuse hémoglobinurique.....	20
V. Diagnostic biologique.....	20
V.1. Frottis sanguin et Goutte épaisse.....	20
V.2. Les tests rapides.....	21
V.3. Le QBC ou «Quantitative Buffy Coat ».....	21
V.4. Méthodes immunologiques.....	21
VI. Traitement.....	22
VII. Prophylaxie.....	22
VII.1. Chimioprophylaxie.....	,,22
VII. 2. Lutte anti-vectorielle.....	23
VIII. Système sanguin ABO et paludisme.....	24
VIII.1. Structure des erythrocytes.....	24
VIII.2. Les antigènes érythrocytaires.....	25
VIII.3. Système ABO et paludisme.....	28

Deuxième partie

I. Méthodologie.....	30
I.1. Justificatifs.....	30
I.2. Cadre de l'étude.....	30
I.3. Population d'étude.....	30
I.4. Prélèvement.....	31
I.5. Extraction de l'ADN de P. falciparum.....	31
I.6. Amplification du gène EBA-175.....	32
I.7. Détermination du groupe sanguin par la méthode de Simonin.....	34

I.8. Analyse statistique.....	34
II. Résultats.....	35
 II.1. Les caractéristiques de la population d'étude.....	35
 II.2. La densité parasitaire et âge.....	36
 II.3. Le génotypage de EBA 175.....	37
 II.4. La distribution des groupes sanguins.....	38
 II.5. Distribution des fragments F et C selon le groupe sanguin.....	39
 II. 6. La température corporelle et densité parasitaire.....	40
 II. 7. Relation entre le type de fragment et l'âge.....	40
 II. 8. Relation entre le groupe sanguin et la densité parasitaire.....	40
 II. 9. Relation entre le groupe sanguin et la température.....	41
 II. 10. Relation entre les allèles de EBA 175 et le sexe, la densité parasitaire, la température.....	41
III. Discussion.....	42
 Conclusions	
 Conclusion.....	45
Références Bibliographiques	
 Bibliographie.....	46

Introduction

Le paludisme est une érythrocytopathie due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il constitue un problème de santé publique en Afrique au sud du Sahara. Deux milliards d'individus dans le monde vivent avec le risque de contracter le paludisme et plus d'un million de personnes en meurent chaque année, en majorité les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes.

La population et l'économie souffrent du paludisme qui entrave le développement cognitif et l'éducation des enfants, ainsi que la capacité des adultes à gagner leur vie et à s'occuper de leur famille [73]. Il existe une corrélation frappante entre le paludisme et la pauvreté; le produit intérieur brut (PIB) moyen des pays impaludés est cinq fois plus faible que celui des pays non impaludés [29]

Avec le réchauffement de la planète, cette maladie qui sévit dans plus de 90 pays pourrait continuer son extension, d'où la nécessité de trouver rapidement des moyens de la contrôler. Ce qui passe nécessairement par la mise au point de vaccins antipaludiques.

Les manifestations cliniques étant dues essentiellement à la rupture des érythrocytes, l'invasion des globules rouges par les merozoites constitue donc une étape importante pour la recherche vaccinale. Cependant la mise au point d'un tel vaccin reste difficile car un seul merozoite qui parvient à entrer dans le globule rouge peut être à l'origine de la maladie.

L'étude des voies d'invasion des globules rouges par les merozoites requière donc une attention particulière..

Cependant, concernant cette phase, peu d'éléments sont actuellement connus. L'Erytrocyte Binding Antigen 175 ou EBA 175, qui est un antigène de *Plasmodium falciparum* de 175 kDa, semble jouer un rôle majeur dans la reconnaissance de l'érythrocyte par le parasite. Il est supposé être en partie responsable de l'invasion des érythrocytes par les merozoites. En effet EBA 175 est considéré comme la voie principale d'invasion.

De plus, d'autres voies d'invasion alternatives ont été identifiées parmi lesquelles figurent les *PfRh Plasmodium falciparum reticulocyte binding protein homolog family*.

Plusieurs facteurs semblent intervenir dans l'invasion des globules rouges par les merozoïtes. Ainsi l'influence du système sanguin ABO dans la survenue ou les manifestations cliniques du paludisme suscite de plus en plus d'intérêt. Par ailleurs beaucoup d'informations nouvelles ont émergé depuis qu'il a été suggéré l'existence d'une relation entre le système ABO et le paludisme il y a de cela 40 ans. [5]

Devant une telle situation nous nous sommes proposés d'étudier

- le polymorphisme génétique au niveau de l'Erythrocyte Bindind Antigen 175
- et la distribution du système sanguin ABO chez des patients atteints de paludisme simple dans la région de Thiès au cours de la période de transmission de l'année 2007.

I. Epidémiologie

I.1. Agent pathogène

Le paludisme est une maladie infectieuse causée par un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis par un moustique, qui est l'anophèle femelle. Le parasite appartient au phylum des *Apicomplexae*, à la classe des *Sporozoa*, à l'Ordre des *Haemosporinae*, à la famille des *Plasmodidae* et au Genre *Plasmodium*.

I.2. Vecteur

Le vecteur du paludisme est un moustique appartenant à la famille des *Culicidés* à la sous famille des *Anophelinés*. Il existe 400 espèces d'Anophèles dont 60 sont vecteurs du paludisme et les plus redoutables sont les espèces anthropophiles. *A. gambiae* (saison des pluies) et *A. funestus* (saison sèche) constituent plus de 98% des espèces retrouvées au Sénégal. [49]

I.3. Mode de transmission

L'homme peut s'infecter de différentes manières dont la plus répandue est l'inoculation du parasite par piqûre au cours d'un repas sanguin; mais on peut avoir une infection au décours d'une transfusion sanguine et dans ce cas le cycle hépatique est court-circuité, et par voie transplacentaire, dans ce cas les plasmodes apparaissent dans le sang du nouveau-né avant le huitième jour de vie.

I.4. Cycle évolutif

Il comporte trois étapes dont deux se déroulent chez l'homme et une chez le moustique.

I. 4.1 Le stade tissulaire ou la schizogonie hépatique

Lors de son repas sanguin, l'anophèle femelle va injecter des sporozoites contenus au niveau de ses glandes salivaires à l'homme. Ces sporozoites sont des éléments fusiformes allongés et mobiles qui vont circuler dans le sang et arriver au niveau du foie pour poursuivre leur développement. Après pénétration dans l'hépatocyte, le sporozoite s'arrondit pour donner une cellule appelée trophozoite. Le trophozoite va croître son noyau pour donner le trophozoite âgé.

Celui-ci se transforme en schizonte qui subit une division de son noyau en plusieurs petits noyaux. Le schizonte qui contient plusieurs petits noyaux borre la cellule hépatique

qui va éclater. Le temps depuis la pénétration du sporozoite dans la cellule hépatique jusqu'à son éclatement dure 3 semaines.

Certaines espèces comme *P. ovale* et *P. vivax* peuvent avoir un développement ralenti au niveau du premier cycle. Ils restent bloqués à l'état d'hypnose et sont appelés hypnosoides. Ce n'est que tardivement que les hypnosoides reprennent leur développement et favorisent l'éclatement de l'hépatocyte. Ces espèces sont responsables des rechutes tardives. Le schizonte va donner le merozoite.

I. 4.2 Le stade sanguin ou schizogonie érythrocytaire

La cellule hépatique libère les merozoites. Certains seront phagocytés mais le plus grand nombre va venir parasiter les globules rouges (GR) et se transformer en trophozoite jeune. Ce dernier se développe et donne le trophozoite âgé qui subit une phase de développement nucléaire et de division donnant le schizonte ou la rosace. Finalement, la cellule sanguine est bourrée de *Plasmodium*. Elle va éclater pour libérer les merozoites et des pigments.

Ce cycle dure 48 heures depuis l'infiltration dans la cellule jusqu'à son éclatement pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* et 72 heures pour *P. malariae*.

Cette phase est responsable de l'accès fébrile qui est simultané à l'éclatement des cellules sanguines.

Certains merozoites vont parasiter à nouveau d'autres cellules sanguines réalisant ainsi d'autres cycles de développement tandis que d'autres se dotent d'un potentiel sexué et se transforment en gamétocytes femelles et mâles.

I. 4.3 La sporogonie

En prenant son repas sanguin chez un individu infesté, l'anophèle femelle va absorber des GR sains et des GR parasités pouvant contenir différents stades parasitaires. Les trophozoites et les schizontes sont digérés, seuls les gamétocytes poursuivront leur développement chez l'anophèle.

Le gamétocyte femelle se transforme en gamète ou macrogamète qui est immobile tandis que le mâle se subdivise en 8 microgamètes qui vont se dégager de la cellule par

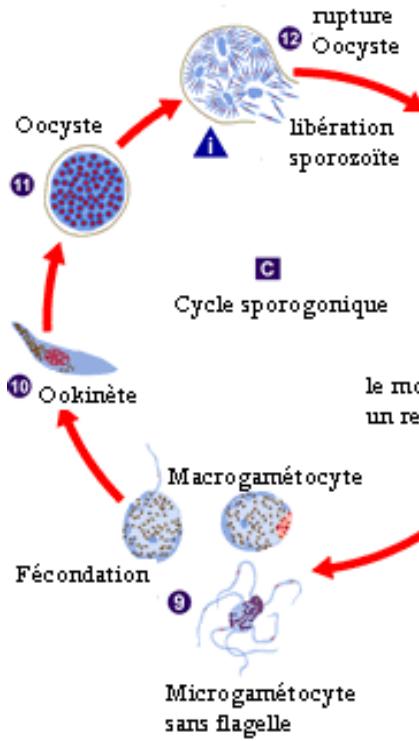
exflagellation. Les microgamètes sont mobiles, ils migrent pour aller à la rencontre du macrogamète pour la formation d'un ookinète qui est un œuf mobile.

Cet œuf mobile s'enfonce dans la paroi de l'estomac entre les cellules épithéliales pour donner l'oocyste qui subit des divisions nucléaires entraînant le développement d'éléments fusiformes appelés sporozoites. Ces sporozoites se dirigent vers la glande salivaire où ils vont achever leur maturation.

L'anophèle est devenu alors infestant après 12 à 18 jours d'évolution.

▲ = Etape infectieuse
d = Etape diagnostique

Etape de l'anophèle



Etape humaine

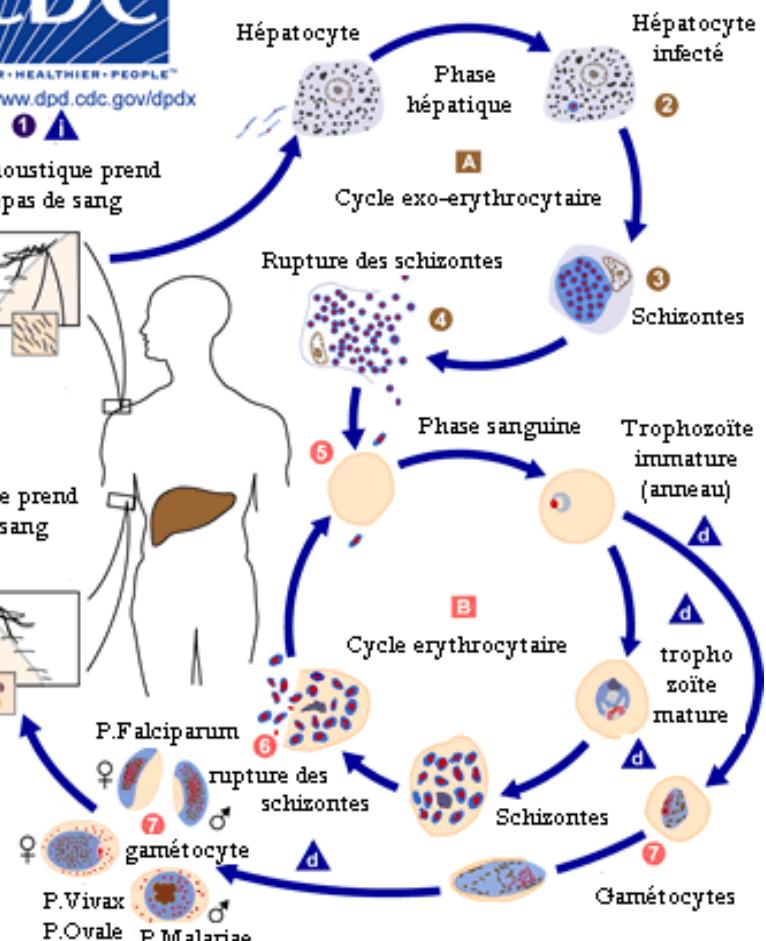


Figure 1: Cycle évolutif de *Plasmodium falciparum*

II. Invasion érythrocytaire

II.1. Ultrastructure du merozoïte et processus d'invasion de l'érythrocyte

La plupart des données sur la structure des merozoïtes ont été obtenues chez *P. knowlesi* car les merozoïtes de cette espèce sont moins fragiles que ceux des autres. La structure des merozoïtes de *P. falciparum* a été décrite par Langreth en 1978. C'est une petite cellule polarisée de forme ovoïde de $1,5\mu\text{m}$ de long et $1\mu\text{m}$ de large. Comme tous les *Apicomplexa*, cette forme parasitaire possède plusieurs types d'organites apicaux: les rhoptries, les micronèmes et les granules denses (**figure 2**). Ceux-ci sont impliqués, de manière séquentielle, dans le processus d'invasion de l'érythrocyte. Le merozoïte est recouvert d'un manteau, sous lequel, en plus de la membrane plasmique, se trouvent deux autres membranes connectées par un important matériel fibrillaire et reliées au cytosquelette.

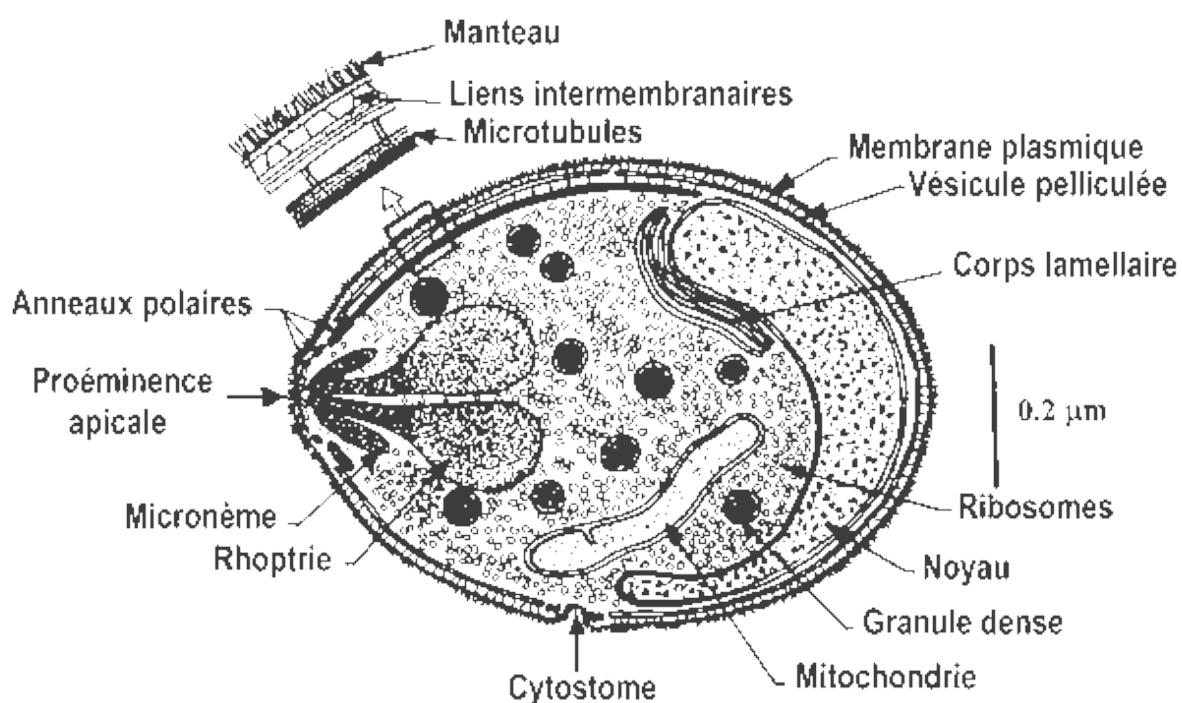


Figure 2: Ultrastructure du merozoïte de *Plasmodium falciparum*

II.2. Ultrastructure des stades intra-érythrocytaires et modifications structurelles de l'érythrocyte infecté

II.2.1. Compartiments intracellulaires du parasite et structures particulières

Comme tout eucaryote, *Plasmodium* possède plusieurs compartiments intracellulaires (**figure 3**). Il présente un noyau dont la membrane ne disparaît pas pendant la mitose (cryptogamie). *P. falciparum* possède un réticulum endoplasmique rudimentaire, cependant la présence d'un véritable appareil de Golgi est encore débattue. Outre la mitochondrie, le parasite possède un autre endosymbionte; l'apicoplaste qui contient l'ADN circulaire de 35kb, reliquat du génome de l'organisme intégré est très proche de l'ADN chloroplastique.

L'apicoplaste est entouré d'une quadruple membrane lipidique. Le cytoplasme parasitaire est délimité par la membrane plasmique. Après l'invasion, le parasite reste dans sa vacuole parasitophore, qui plonge ses ramifications, en réseau de tubules et vésicules, dans le cytoplasme de l'érythrocyte pour former le Réseau Tubo-Vésiculaire (ou TVN). Au point d'initiation de l'invasion pourrait subsister un point de contact entre le TVN et la membrane plasmique de l'érythrocyte, ouvert sur le milieu extérieur: le " duct ".

Il existe aussi un point de contact entre la membrane plasmique parasitaire et la membrane de la vacuole parasitophore, qui s'invaginent, toutes deux, pour former le cytostome. Ce dernier constitue une sorte de vésicule d'endocytose du cytoplasme de l'érythrocyte, et est dirigé vers la vacuole digestive du parasite, où le contenu du cytoplasme érythrocytaire est dégradé (principalement l'hémoglobine) et l'hème polymérisé en hémozoïne, le pigment parasitaire.

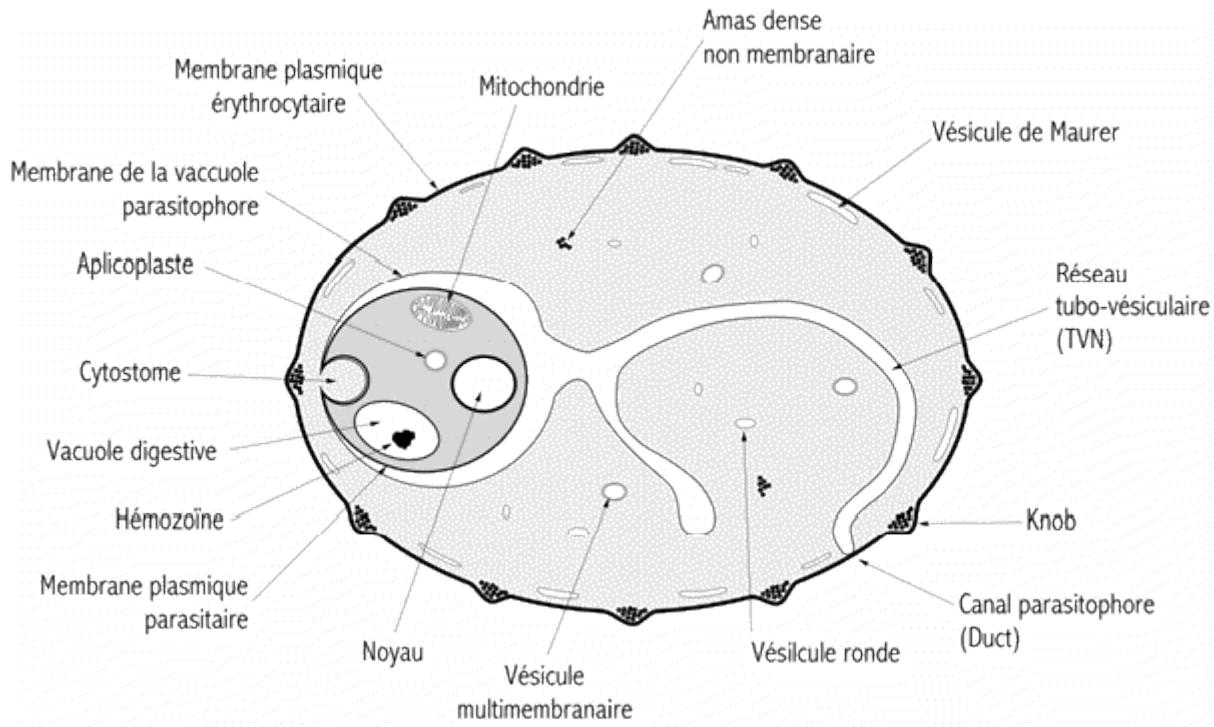


Figure 3: Représentation schématique de l'érythrocyte parasité.

II.2.2. Modifications structurelles de l'érythrocyte par le parasite

Le parasite modifie aussi l'érythrocyte lui-même. En effet, il modifie la composition lipidique de la membrane plasmique érythrocytaire, ainsi que certaines protéines de la cellule hôte comme la bande 3 ou la protéine 4.1. Il installe de nouveaux compartiments membranaires localisés sous la membrane plasmique érythrocytaire, les vésicules de Maurer. De plus, il exporte des protéines parasitaires dans le cytoplasme ou à la membrane érythrocytaire.

D'autre part, il existe à la surface de la membrane érythrocytaire des structures semi-cristallines, denses, formant des protubérances, appelées "knobs". *P. falciparum* est le seul des quatre espèces plasmodiales humaines à les posséder. Les hématies infectées portent les knobs au stade trophozoite âgé et schizonte. Ces "knobs" contribuent à la séquestration des érythrocytes parasités au niveau des capillaires périphériques et dans certains organes comme la rate, les poumons et le cerveau. Ceci explique que l'on ne détecte pas de parasites au stade de schizonte dans la circulation périphérique. Ce phénomène de séquestration est associé à la gravité des symptômes. En effet, l'obstruction des vaisseaux, même partielle, pourrait entraîner une surpression et une hypoxie locale (effet Sludge).

II.3. Mécanismes d'invasion des globules rouges

L'invasion érythrocytaire est un processus rapide gouverné par des interactions moléculaires entre les merozoites et la surface des cellules hôtes. [31]. Les merozoites s'attachent à la surface des globules rouges, se réorientent vers leur pôle apical ensuite il y a formation d'une jonction serrée entre l'hôte et la partie apicale constituant la vacuole parasitophore isolée. [31]

Chez *P. falciparum* des études avec des GR traités par des enzymes [27; 84] ou provenant de donneurs et dépourvus de certains antigènes de surface [48; 56; 23; 55] ont permis d'identifier un certain nombre de récepteurs érythrocytaires utilisés par les merozoites lors de l'attachement. Ces récepteurs incluent les glycophorines A [76], B [23], C [45] en plus des récepteurs appelés X [23] Y [62], Z [25] et E [33]. La dépendance sur ces récepteurs pour l'invasion est connue chez plusieurs parasites [23; 50; 10] aussi bien pour les souches de laboratoire que pour les souches provenant de patients [7; 54]. De plus chez certaines souches de laboratoire telles que W2mef et son clone Dd2 la dépendance à différents récepteurs pour l'invasion peut changer suivant aussi bien la perturbation au niveau du récepteur hôte [22] que la modification du ligand parasitaire auquel il s'attache. Le complexe apical qui est spécifique des *Apicomplexa* possède deux principaux corps vésiculaires terminés par des micronèmes et des rhoptries.

Deux familles de protéines parasitaires localisées au niveau de ces organelles seraient à l'origine de la dépendance de ces récepteurs aux différentes souches de parasites. La première famille est une homologue de la Duffy Binding Protein de *P. vivax* [1; 76] EBA 140 [84; 45] encore connu sous le nom de BAEBL [1] et EBA 181 [33] encore appelé JESEBL [1]. Les protéines EBA se lient aux résidus acide sialique des glycophorines A, C et au récepteur inconnu E respectivement sur la surface des globules rouges et sont sensibles au traitement par la neuraminidase sialidase [47; 33; 45; 77]. Le deuxième groupe de protéines sont de haut poids moléculaire et sont des homologues des reticulocytes binding proteins de *P. vivax* [28]. Il inclut les protéines *Plasmodium falciparum Reticulocyte binding like Homolog-1*(PfRh1) [62 ; 86], PfRh2a, PfRh2b [25 ; 61] et PfRh4 également connues sous le nom de NBP proteins-1, 2a, 2b et 4 [62 ; 61 ; 38]. PfRh1 se lie à la surface des GR via un récepteur inconnu appelé Y qui est acide sialique dépendant alors que les liaisons qui caractérisent PfRh2b (qui a son récepteur inconnu appelé Z) et PfRh4 sont acide sialique indépendantes. La liaison caractéristique de PfRh2a n'est pas connue.

Il est également évident que pour la variabilité de l'expression des EBA fonctionnels et des PfRh dans différentes voies utilisées par le parasite, il y a un facteur qui peut soutenir l'utilisation des voies alternatives d'invasion [25 ; 86]. Les deux familles incluent également des pseudogènes proposés comme étant EBA 165 (PFD1155w) [87] et PfRh3 (PFL2520w) [82] respectivement. Cependant, ils ne sont pas transcrits, n'apparaissant donc pas sous forme de protéines.

La souche 3D7 de *P. falciparum* qui a été totalement séquencée [30] peut parasiter les GR par voie acide sialique dépendant, et acide sialique indépendant [25]. Des études antérieures ont montré avec succès la perturbation de l'expression de EBA 140 [45], EBA 175 [24], PfRh1, PfRh2a et PfRh2b [25] chez la souche 3D7 par la stratégie de suppression des gènes. Dans chaque cas il n'y a pas eu de changement mesurable dans l'envahissement des GR normaux. Ceci démontre une possible abondance des voies d'invasion et que le rôle de chaque protéine n'est pas indispensable ou peut être compensé [25 ; 45 ; 24].

Les souches de 3D7ΔEBA-175, qui sont des clones de la souche 3D7, parasitent les GR traités par la chymotrypsine avec une réduction importante comparée à la souche parentale. Ceci suggère que EBA 175 est fonctionnel chez cette dernière et le phénomène observé est le résultat de la perturbation du gène. Le parasite mutant a un répertoire réduit de récepteurs potentiels de l'invasion [45 ; 24] bien qu'il y ait des récepteurs alternatifs et qui ne sont pas connus.

La perturbation des voies utilisant PfRh1, PfRh2a, ou EBA 140 chez 3D7 ne résulte pas d'une notable altération de la sensibilité de l'invasion même lorsqu'on utilise des globules rouges traités par des enzymes suggérant que ces protéines jouent un rôle moindre au niveau de la souche parentale [25 ; 45 ; 86]. Contrairement aux autres voies de suppression et la souche parentale de 3D7, le parasite 3D7ΔRh2b utilisent des récepteurs résistants à la chymotrypsine. [25] Ceci suggère que c'est une voie d'invasion qui n'est pas normalement utilisée par la souche parentale mais plutôt par la souche mutante. Il reflète le phénotype observé lorsque la fonction de EBA 175 est enlevée chez W2mef (un parasite qui est habituellement sensible à la neuraminidase) résultant d'une modification dramatique de l'invasion indépendante à l'acide sialique [63].

De nouvelles voies d'invasion utilisées par le parasite 3D7ΔRh2b ont été analysées, et ont suggéré que les changements du ligand récepteur dépendant des parasites sont dirigés par une hiérarchie d'interactions moléculaires ou non, au moins pour le cas de 3D7, par activation de nouveaux ligands. Ce mécanisme pourrait fournir aux parasites la capacité de s'adapter

rapidement à la réponse immune dirigée contre les ligands d'une première invasion ou à un polymorphisme au niveau des récepteurs du globule rouge.

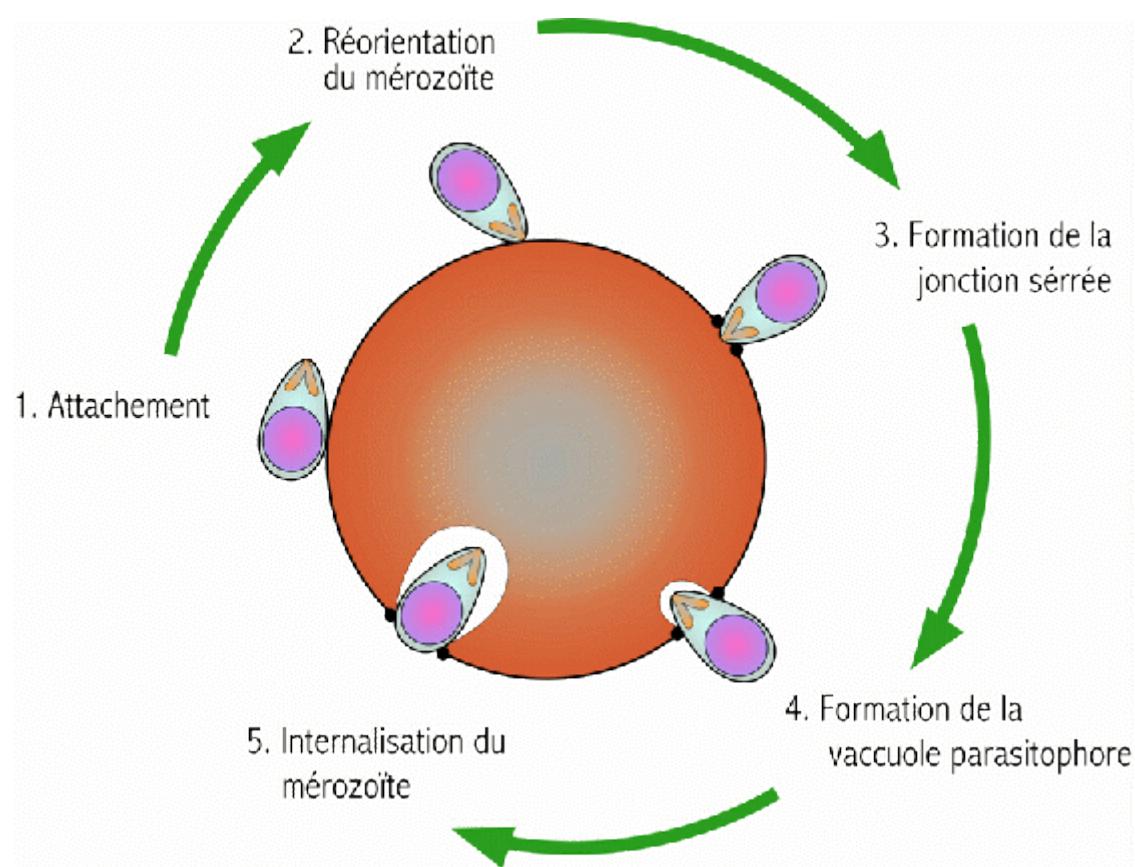


Figure 4: Processus d'internalisation du merozoïte dans le globule rouge

III. Le Génome

Le génome de *P. falciparum* est composé de 14 chromosomes et de deux génomes extra chromosomiques. Il possède 6.000 à 7.000 gènes.

III. 1. Structure et composition

Le génome nucléaire de la souche 3D7 de *P. falciparum* est composé de 22,8 mégabases (Mb) répartis en 14 chromosomes avec une taille allant de 0,643 à 3,29 Mb par chromosome. Sa composition totale en A et T est de 80,6% et atteint 90% au niveau des introns et des régions inter géniques.

Les structures des protéines codées par ces gènes ont été prédites en utilisant plusieurs programmes de recherche de gènes et arrangées manuellement. Environ 5300 protéines codées par ces gènes ont été identifiées et c'est presque ce même nombre qui a été retrouvé chez *Saccharomyces pombe*. Ceci suggère l'existence en moyenne chez *P. falciparum* d'une densité au niveau des gènes de 4338 paires de bases par gène. Ce sont sensiblement les mêmes valeurs qui ont été retrouvées auparavant avec les chromosomes 2 et 3 (4500 paires de bases par gène et 4800 par gène respectivement) qui furent les premiers à être totalement séquencés.

Les introns ont été estimés à 54% des gènes de *P. falciparum*. En dehors des introns, la longueur des gènes de *P. falciparum* est de 2,3 Kb, et est plus importante comparée aux autres organismes chez qui la longueur des gènes est en moyenne de 1,3 à 1,6 Kb. *P. falciparum* est marqué par une grande proportion de gènes (15,5%) longs de plus de 4 Kb comparé à *S. pombe* 3% et *S. cerevisiae* 3,6%. Plusieurs de ces gènes codent pour des protéines non caractérisées qui peuvent être des protéines cytosoliques, et ne possèdent pas de signal de peptides reconnus.

Près de 52% des produits estimés de ces gènes ont été détectés dans des lysats cellulaires préparés à partir de plusieurs stades du cycle évolutif du parasite par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et spectrophotométrie de masse. Ils incluent plusieurs protéines prédites n'ayant aucune similarité avec les protéines des autres organismes.

En plus, 49% de ces gènes se chevauchent (plus de 97% d'identité pour au moins 100 nucléotides) avec des « expressed sequences tags » (EST) qui dérivent de plusieurs stades du cycle évolutif. Les EST sont de courtes séquences d'ADN (environ 200 à 300 pb) qui sont

utilisées à des fins d'identification des gènes exprimés. Les études sur les protéines et celles portant sur les EST faites à ce jour ne permettent pas de représenter un échantillon complet de tous les gènes exprimés lors du cycle évolutif complexe du parasite. Les ESTs et les séquences [93] d'ADNc (l'ADN complémentaire constitue un simple brin d'ADN qui est une copie d'un ARN obtenue après une transcription inverse) interviennent pour le développement de meilleurs outils nécessaires pour les programmes de recherche de gènes et la vérification des gènes prédits.

Le génome nucléaire contient une quantité importante d'ARN de transfert (ARNt) et 43 d'entre eux ont été identifiés et peuvent lier tous les codons sauf les codons TGT et TGC qui codent pour la cystéine.

Dans la plupart des organismes eucaryotes séquencés à ce jour, les gènes des ARNt montrent une très grande redondance. La seule exception se trouve au niveau intracellulaire du parasite *Encephalitozoon cuniculi* qui contient 44 ARNt. [26 ; 39 ; 52]

Le génome mitochondrial de *P. falciparum* est petit (environ 6 Kb) et ne code pas d'ARNt. Donc la mitochondrie utilise des ARNt provenant du cytoplasme. [88; 89] Cette importation d'ARNt à partir du cytoplasme peut servir à la synthèse des protéines au niveau de la mitochondrie de la même manière que cela se fait avec les autres organismes [80 ; 81]

Le génome de l'apicoplaste apparaît comme codant suffisamment d'ARNt pour la synthèse dans cet organe [94 ; 98]

III. 2. Structure des chromosomes

Les chromosomes de *P. falciparum* varient considérablement en longueur, avec une plus grande variation au niveau des régions subtélomériques. Des isolats de *Plasmodium* provenant d'individus résidant dans un même village [6] montre un très grand polymorphisme qui est dû à une recombinaison entre différents clones du parasite durant la méiose chez le moustique. [35] La variation de taille des chromosomes est également observée avec les cultures des formes érythrocytaires du parasite, mais ceci est dû à des événements de cassure et réparation et non à une recombinaison durant la méiose. [34 ; 72]

Les délétions subtélomériques s'étendent souvent bien dans le chromosome et dans certains cas vont altérer les propriétés d'adhésion du parasite en raison de la perte de ou des gènes codant pour l'adhésion des molécules. [19 ; 59]

Plusieurs gènes intervenant dans la variation antigénique sont localisés au niveau des régions subtélomériques. L'élucidation des mécanismes sousjacentes de la génération de diversité antigénique nécessite une compréhension de la structure et des propriétés fonctionnelles du subtélomère.

Les régions subtélomériques des chromosomes montrent un réel degré de conservation dans le génome. Les changements subtélomériques se produisent également chez les eucaryotes [44 ; 70], mais les régions concernées sont assez petites (2.5 – 3.0 Kb), tel que chez *S. cerevisiae*. Des études antérieures des télomères de *P. falciparum* suggèrent qu'ils contiennent 6 blocs de séquences répétitives qui ont été appelés Telomeres-Associated Repetitive Elements. Les régions conservées sont réparties en 5 larges blocs subtélomériques.

Les centromères n'ont pas été identifiés expérimentalement chez *Plasmodium*. Cependant des centromères "potentiels" ont été identifiés par comparaison de séquences des chromosomes 2 et 3. [11] Onze des 14 chromosomes contiennent une région unique de 2 à 3 Kb avec un taux de A et T extrêmement élevé (supérieure à 97%) et des tandems courts imparfaits répétitifs. Pour les trois autres chromosomes, ces régions sont incomplètes.

III. 3. Les protéines

Des 5268 protéines prédites, environ 60% n'ont pas suffisamment de similarité avec les protéines des autres organismes. Ceci corrobore les données obtenues avec les chromosomes 2 et 3. [11 ; 32] Ainsi, presque 2/3 des protéines sont considérées comme étant propre à cet organisme. Cette proportion est beaucoup plus élevée que chez les autres eucaryotes. Ceci peut suggérer comme réflexion une grande distance d'évolution entre *Plasmodium* et les autres eucaryotes dont les génomes ont été séquencés.

Environ 5% des autres protéines ont une similarité considérable avec les protéines hypothétiques des autres organismes. Le terme utilisé pour décrire les rôles des gènes et leurs produits dans l'organisme, est appelé Gene Ontology (GO). [4]

Au moins 1,3% des gènes de *P. falciparum* interviennent dans l'adhésion cellulaire ou dans l'invasion cellulaire. *P. falciparum* a 3,9% de gènes connus qui interviennent dans les processus immunitaires. Ceci reflète l'utilisation du terme « processus physiologique » chez *P. falciparum*.

Le génome de l'apicoplaste est de 35 Kb. Il code pour seulement 30 protéines. [95] Mais comme pour les mitochondries et les chloroplastes, les protéines de l'apicoplaste sont renforcées par des protéines codées par le génome. [68 ; 90 ; 96]

Au total 551 protéines codées par le génome nucléaire (environ 10% des protéines nucléaires) qui peuvent être des cibles au niveau de l'apicoplaste ont été identifiées en utilisant la bioinformatique, [95] la spectrométrie de masse et des méthodes de laboratoire.

Le génome nucléaire code pour des protéines de l'apicoplaste incluant des enzymes intervenant dans la réplication de l'ADN, la réparation, la transcription, la synthèse de cofacteurs, l'importation et la recapture des protéines, les métabolismes spécifiques et les activités de transport. Les fonctions d'environ 60 % des cibles potentielles des protéines de l'apicoplaste, ne sont pas bien connues.

III. 4. Ploïdie génomique

Chez l'homme *P. falciparum* se présente sous la forme haploïde alors que chez l'anophèle il est haploïde et diploïde. Des études ont montré que le parasite, dans la plus part de son cycle évolutif, se présente sous la forme haploïde sauf durant la courte phase de formation de zygote. [91]

La diversité génétique est l'une des plus importantes caractéristiques de l'espèce *Plasmodium* et semble avoir un lien avec le fait que la reproduction sexuée est une phase obligatoire du cycle parasitaire.

III. 5. Mécanismes intervenant dans le polymorphisme

Les réarrangements importants, au cours de la mitose, entraînent des variations fréquentes de la taille des chromosomes de *P. falciparum*. On note chez *P. falciparum* près de 25% de variation de la longueur des chromosomes homologues. Cette différence de taille est due aux délétions au niveau de la région terminale des chromosomes pendant la mitose. Des études qui ont été menées après culture *in vitro* ont montré des délétions de plusieurs gènes se trouvant sur les régions subtélomériques des chromosomes par exemple les gènes codant pour le HRPI et le HRPII, le gène RESA, pf87 et pf332 qui se trouvent respectivement sur la région subtélomérique des chromosomes 1, 2, 3, 8 et 11 [58 ; 13 ; 60 ; 72 ; 73 ; 42 ; 46].

Une autre délétion au niveau de la région subtélomérique du chromosome 9 apparaît fréquemment, durant l'adaptation du parasite en culture *in vitro*. [75 ; 19] La délétion subtélomérique apparaît comme étant un caractère général des chromosomes de

P. falciparum. La recombinaison génétique intervient également de manière importante dans la diversité génétique du parasite. Chez les eucaryotes, elle a lieu principalement en phase de méiose et rarement en mitose. Au cours de la méiose on peut observer des assortiments indépendants de gènes sur des chromosomes différents, des crossing-over entre des gènes se trouvant sur le même chromosome et des recombinaisons intra géniques. Les deux premières donnent des formes avec de nouvelles combinaisons de gènes alors que le troisième entraîne la formation de nouveaux allèles.

Parmi les souches de terrain de *P. falciparum*, un polymorphisme important a été noté au niveau de la taille des chromosomes [17 ; 8] montrant que des réarrangements apparaissent fréquemment sans pour autant détruire le parasite. Des délétions dans la région subtelomérique, similaires à celles observées en culture *in vivo* apparaissent chez les souches de terrain. Cependant, chez les souches de terrain la délétion se limite au niveau de la partie non codante rep20 et ne contenant généralement pas de gènes transcrits. [8 ; 73]

III. 6. Gène EBA-175

Au cours du contact initial du merozoite avec l'érythrocyte, la réorientation amène la terminaison apicale en contact avec la surface du globule rouge [51]. Le contenu des organelles apicales incluant les rhoptries et les micronèmes est libéré et une jonction serrée est formée entre la membrane du globule rouge et la surface du merozoite [2]. EBA 175 est localisé dans les micronèmes et a été identifié comme le ligand du merozoite qui lie au niveau du glycophorine A un site acide sialique dépendant [76]. Ceci constitue un pont entre le parasite et la cellule hôte.

Lorsque EBA 175 est sécrété, sa région II riche en cystéine peut se lier avec le glycophorine A sur la surface érythrocytaire, une interaction qui est probablement importante dans les voies d'invasion glycophorine A dépendante [76]. L'erythrocyte binding antigen 175 est divisé en un nombre de domaines incluant trois régions riches en cystéine (F₁, F₂ et C). F₁ et F₂ au niveau N terminal sont responsables de la liaison du glycophorine A à la membrane de l'érythrocyte. La plupart des séquences de EBA 175 ont en commun un nombre réduit d'aminoacides (AA) polymorphiques dans la région II parmi les allèles de *P. falciparum*. [78 ; 43]

La partie centrale du gène appelée région III constitue une exception. L'analyse des séquences de deux souches différentes de *P. falciparum* a montré deux segments hautement différents: FCR₃ et CAMP [41 ; 79]. Les segments de ces deux souches sont proches exceptée

une région dimorphique au niveau de FCR₃ (fragment F) pour l'une des souches et au niveau de CAMP pour l'autre souche (fragment C).

Le gène FCR₃ possède 1462 AA, alors que le gène CAMP est long de 1435 AA. Cette variation de 27 AA est causée par des différences au niveau de la 423^{ème} paire de base du fragment F (141 AA) et 342^{ème} pb (114 AA) du fragment C. Ces deux allèles sont insérés légèrement dans différentes positions au niveau de la région III du gène EBA 175 où le fragment F possède 91 aminoacides de plus que le fragment C mais ce sont des allèles vrais.

Ces souches parasitaires haploïdes possèdent soit l'un ou l'autre des fragments mais jamais les deux à la fois. [92]

Les effets et les fonctions de ces deux fragments restent mal connus. Des études antérieures ont indiqué que ces régions dimorphiques sont aussi impliquées dans le processus d'invasion après la liaison initiale entre le merozoite et le globule rouge. Il est supposé que le clivage protéolytique de EBA 175 est suivi par la liaison des régions dimorphiques à la glycophorine A de l'erythrocyte. [37 ; 92]. Il est considéré que les différences au niveau des voies alternatives d'invasion (différences entre dans la dépendance aux acides sialiques ou aux polypeptides sensibles à la trypsine sur le globule rouge) peuvent être associées aux allèles Cseg/Fseg du parasite mais cela n'a pu être démontré. [10]

La distribution de ces deux fragments de EBA 175 a été étudiée dans cinq populations africaines (Gambie, Nigéria, Gabon, Afrique du sud et Soudan). Les résultats n'ont pas montré une sélection naturelle concernant l'un de ces deux allèles. [9] Les sérum de sujets exposés à *P. falciparum* contiennent des IgG qui réagissent avec les protéines recombinantes des séquences Cseg et Fseg [18 ; 53]. Des études sérologiques en Gambie ont montré que les polymorphismes F et C de EBA 175 ne sont pas associées avec une protection ultérieure contre les manifestations cliniques du paludisme. [53] Si les anticorps acquis naturellement étaient protecteurs alors les formes alléliques seraient maintenues sélectivement par un processus fréquent.

IV. Symptomatologie du paludisme à *Plasmodium falciparum*

IV. 1. L'accès « simple » à *P. falciparum*

Par définition les accès « simples » ne comportent pas de signes de malignité, mais ils peuvent à tout moment évoluer vers l'accès pernicieux, d'où l'importance de leur diagnostic

et de leur traitement précoce. Ils apparaissent après une incubation brève de 7 à 15 jours suivant la piqûre infestante.

La fièvre est au premier plan, souvent continue à 39-40°C ou rémittente avec plusieurs clochers quotidiens. Au bout de quelques jours d'évolution, elle devient parfois intermittente, surtout s'il s'agit d'une réinfestation. Cependant, les accès thermiques sont irréguliers.

La symptomatologie est très variable. Les frissons et la sueur sont habituels. Les myalgies, les courbatures, les céphalées frontales sont intenses. La sensation de malaise général est marquée. Les troubles digestifs sont fréquents chez l'enfant à type de nausées, de vomissements, de diarrhées, de douleurs abdominales notamment de l'hypochondre gauche. Les manifestations respiratoires peuvent égarer le diagnostic.

A l'examen, outre un hépatomegalie, on note presque toujours une hépatomégalie et parfois une splénomégalie. Cette dernière manque au début et n'apparaît qu'après un certain délai d'évolution. Elle est fréquente au cours des accès de réinfestation.

IV. 2. L'accès pernicieux

On l'appelle également neuropaludisme, caractérisée par l'importance de la souffrance cérébrale. Il constitue le grand drame du paludisme à *P. falciparum*. Cette encéphalopathie aigüe fébrile résulte d'une intense multiplication des hématozoaires dans les capillaires viscéraux et notamment intracérébraux. L'OMS définit le paludisme sévère comme la présence d'hématozoaires dans le sang, associée à l'un des signes suivants : fièvre à plus de 40°C, pouls à plus de 200/mn, coma d'emblée, état de mal convulsif, hypertonie surtout paroxystique, anémie à moins de 3g/dl, œdème pulmonaire, hépatomégalie, déshydratation et hypoglycémie

Le neuropaludisme atteint les sujets dépourvus d'immunité. En zone de forte endémie, il s'agit surtout des enfants de 4 mois à 4 ans et des sujets neufs récemment transplantés s'ils négligent leur chimioprophylaxie. En zone d'hypo-endémie ou de paludisme saisonnier, les adultes autochtones mal prémunis ne sont pas à l'abri des accès pernicieux. Lié à une parasitémie intense, l'accès pernicieux est surtout fréquent sous les tropiques, en fin d'hivernage, période de transmission active du paludisme.

L'évolution de l'accès pernicieux dépend enfin de la rapidité et de la qualité du traitement. Non traité, il est le plus souvent fatal en deux ou trois jours. Quand il est traité

avec retard, la mortalité peut atteindre 30 % à 50 % des cas. Rapidement et correctement traité, la guérison survient sans séquelles.

IV. 3. Le paludisme viscéral évolutif à *P. falciparum*

Le paludisme viscéral à *P. falciparum* survient lorsqu'un sujet insuffisamment ou non prévenu ne se soumet à aucune chimioprophylaxie ou à une chimioprophylaxie peu efficace dans la région et se trouve exposé à des infestations répétées. Le tableau associe une anémie importante, une splénomégalie avec périsplénite, une fébricule autour de 38°C et parfois des poussées thermiques plus importantes. Le pronostic du paludisme viscéral évolutif à *P. falciparum* est beaucoup plus sévère que celui à *P. vivax*. Cachexie et retard staturo-pondéral sont fréquents chez l'enfant. La rupture traumatique de l'énorme rate est possible. A tout moment, un accès pernicieux risque d'emporter le malade. Les antipaludiques apportent une guérison spectaculaire.

IV. 4. La fièvre bilieuse hémoglobinurique

Elle est exceptionnelle de nos jours. C'est un syndrome « para palustre », survenant chez d'anciens paludéens à *P. falciparum* soumis à une chimioprophylaxie irrégulière par la quinine.

V. Diagnostic biologique

La mise en évidence de l'hématozoaire dans le sang est seule capable d'apporter une certitude diagnostique.

V. 1. Frottis sanguin et Goutte épaisse

Les prélèvements de sang sont pratiqués avant toute prise d'antipaludiques, de préférence à l'occasion d'un clocher thermique. La recherche du parasite s'effectue sur frottis et sur goutte épaisse, colorés par la méthode de Giemsa ou de May Grunwald Giemsa qui teinte le cytoplasme en bleu et le noyau en rouge.

La GE réalise une concentration, elle permet d'examiner une plus grande quantité de sang et donc de dépister une parasitémie moindre. Cependant, l'identification de l'espèce

plasmodiale est difficile. Le délai de plusieurs heures qu'elle nécessite est un inconvénient pour un diagnostic qui doit être porté d'urgence.

Le frottis, au contraire, peut être coloré immédiatement et permet un diagnostic précis d'espèce. L'association frottis goutte épaisse doit être systématique. Elle se pratique volontiers sur la même lame lors d'enquêtes épidémiologiques

V. 2. Les tests rapides

Ces méthodes sont basées sur le principe de la détection du HRP-2 plasmodial (histidin rich protein 2) ou de la LDH (lacticodéshydrogénase) du parasite. Elles ont la possibilité de renforcer non seulement la vitesse mais aussi l'exactitude du diagnostic du paludisme à *P. falciparum*. Cependant, elles ne peuvent pas donner une idée exacte de la densité parasitaire. Par ailleurs, le test utilisant le HRP-2 détecte les antigènes circulants du parasite plusieurs jours après l'élimination des parasites. De ce fait il faut avoir en mémoire qu'un test positif ne signifie pas toujours une infection active. Les tests basés sur la recherche de la LDH permettent de diagnostiquer la présence d'autres espèces plasmodiales.

V. 3. Le QBC ou «Quantitative Buffy Coat »

Il est basé sur la centrifugation du sang recueilli sur tube capillaire contenant de l'acridine. Après la centrifugation, l'interface entre les globules blancs et les GR est examinée au microscope à fluorescence et l'ADN des parasites se lie à l'acridine orange. Cet ADN, se présente alors au microscope sous forme de taches brillantes.

Cette technique apparaît plus sensible que la GE et le frottis, cependant l'identification des espèces demeure difficile et son coût est prohibitif.

V. 4. Méthodes immunologiques

L'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination, les tests de précipitation (immunodiffusion et électrosynérèse), et la méthode immuno-enzymatique ELISA, ont été appliqués au dépistage sérologique du paludisme.

Seule l'immunofluorescence a vu sa pratique se généraliser. Elle est de valeur inégale selon que l'on utilise un antigène homologue spécifique (frottis de *P. falciparum* surtout, de *P. vivax* et de *P. malariae*) d'obtention et de conservation difficiles ou hétérologue (*P. cynomolgi*, *P. fieldi*, *P. berghei*).

Les autres méthodes immunologiques sont plus rapides à réaliser, nécessitent peu de matériels, et sont à cet égard des techniques d'avenir notamment en épidémiologie. Les tests de précipitation, de sensibilité comparable à l'immunofluorescence sont qualitatifs. Ils permettent l'identification des anticorps dirigés contre les antigènes L thermolabiles. Ils sont de grande valeur diagnostique.

VI. Traitement

La plupart des antipaludiques sont des schizonticides. Ils ont une action sur les formes endoérythrocytaires du cycle schizogonique. Ils suppriment (traitement curatif) ou préviennent (prophylaxie suppressive) l'apparition des symptômes cliniques.

En plus des schizonticides, il existe les gamétocytocides qui ont une action sur les formes à potentiel sexué. Ils ont en outre un certain degré d'activité sur les formes exoérythrocytaires tissulaires mais ont une tolérance très inférieure à celle des schizonticides.

VII. Prophylaxie

VII. 1. Chimioprophylaxie

Elle n'est plus recommandée par l'OMS pour les individus vivant en zone d'endémie palustre à moins que ce ne soit une femme enceinte ou un tout jeune enfant.

La chimioprophylaxie est actuellement remplacée par le traitement présomptif intermittent (TPI) qui peut réduire considérablement les effets du paludisme chez la femme enceinte et le nouveau-né. Il s'agit d'un nouveau concept qui consiste à administrer à doses curatives un antimalarial dans le but d'empêcher la survenue de paludisme.

L'OMS recommande de donner deux doses de TPI à la femme enceinte pendant les deuxième et troisième trimestres de la grossesse. Si la femme n'est venue en consultation que pendant le troisième trimestre, elle reçoit deux doses de TPI espacées d'une semaine en cas d'utilisation de la SP.

VII. 2. Lutte anti-vectorielle

Il s'agit d'une lutte contre les insectes en général, grands pourvoyeurs de maladies tropicales, responsables de plusieurs millions de décès par an, à travers le monde. Ainsi, la lutte anti-vectorielle apparaît-elle comme une priorité dans les pays exposés, c'est à dire la majeure partie des pays tropicaux. Pour cela, il faut:

- Eradiquer les gîtes larvaires autour des villas d'habitation, il faut autant que possible supprimer toutes collections d'eau stagnante, vieux pneus, flaques d'eau, pots de fleurs... Les collections d'eau qui ne peuvent pas être supprimées pour des raisons techniques doivent être traitées (épandage de produit de type ABATE ® à la dose de 10 mg par m³ d'eau à traiter).
- Recouvrir tout réservoir, vase ou puits contenant de l'eau afin de réduire les lieux de reproduction d'insectes ou sinon il faut changer l'eau toutes les 24 heures. En réduisant les lieux de reproduction d'insectes, on diminue le nombre d'insectes, donc on diminue les risques de maladie ;
- Débroussailler et faucher les hautes herbes dans un rayon de 400 m autour des lieux de vie ;
- Garder les portes et les fenêtres toujours fermées ;
- Mettre des grillages fins aux fenêtres (moustiquaires) et s'assurer régulièrement qu'il n'y a aucun trou. Les bouches d'aération et de ventilation doivent aussi être grillagées. La climatisation est très efficace car le froid ralentit l'activité et la reproduction des insectes ;
- Utiliser des diffuseurs électriques : ils protègent une chambre pendant 45 nuits (8 à 10 heures par nuit) en diffusant régulièrement un insecticide inoffensif (alléthrine ou pyréthroïde). Les spirales insecticides à combustion lente assurent également une bonne protection et tuent les insectes. Elles peuvent être utilisées sous une véranda ou dans une pièce aérée. Elles protègent pendant 6 à 8 heures.
- Utiliser la moustiquaire chimiquement imprégnée : c'est de loin la protection la plus facile, la moins chère et la plus efficace contre les insectes. C'est une protection aussi efficace à l'intérieur qu'à l'extérieur de la maison. Elle doit toujours être utilisée même lorsque le climatiseur est en marche. Elle doit être imprégnée deux fois par an à la perméthrine ou à la deltaméthrine (K-OTHRINE ®), qui sont d'excellents insecticides. Afin de la garder en bon état, dans la journée elle doit toujours être maintenue attachée. L'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide réduit de 70 % le

risque de transmission du paludisme dans une région où le paludisme est endémique. C'est idéal pour protéger les jeunes enfants et les femmes enceintes qui ne peuvent pas toujours utiliser les autres mesures contre le paludisme.

- Utiliser les bombes insecticides type NEOCIDE ® BAYGON ® ou CATCH ®: elles offrent une protection de très courte durée, juste quelques minutes après leur pulvérisation mais elles sont utiles, par exemple, avant d'entrer dans une pièce, ou avant d'aller dormir pour tuer tout insecte ayant pu pénétrer dans la pièce pendant la journée. Elles complètent l'action rémanente des diffuseurs d'insecticide électriques.

Par contre certaines mesures ne sont pas très efficaces dans la lutte contre les insectes. Par exemple les ultrasons n'ont aucune efficacité prouvée contre les moustiques, la citronnelle malgré sa bonne réputation comme répulsif, est très faiblement efficace et les lampes à ultraviolets peuvent tuer beaucoup d'insectes (papillons, mouches, moucherons, etc.) mais pas toujours ceux qui transmettent des maladies.

VIII. Système sanguin ABO et paludisme

VIII. 1. Structure des érythrocytes

Les érythrocytes sont des cellules se présentant sous la forme d'une lentille creuse des deux côtés (biconcave), d'un diamètre de 7 à 8 micromètres. Ils sont dépourvus de noyau et issus des érythroblastes médullaires. Leur rôle le plus important est d'assurer le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus. Leur membrane se présente sous la forme classique c'est à dire une bicouche lipidique contenant de nombreuses protéines membranaires (dont les canaux ioniques, indispensables aux échanges gazeux). Cette membrane est constituée de 42% de lipides, des glucides 8% et des protéines 50%.

Les protéines extrinsèques transmembranaires assurent la transmission des messages de l'extérieur vers l'intérieur et les protéines du cytosquelette essentiellement la spectrine (alpha et bêta) qui permet le maintien de la structure du globule rouge lorsqu'elle est sous la forme tétramérique, et la protéine 4.1 dont le rôle est de faciliter la liaison entre la spectrine et l'actine. L'ankyrine, est une protéine d'ancre qui a pour rôle de rattacher le squelette membranaire au reste de la membrane (entre la chaîne bêta de la spectrine et la protéine bande 3).

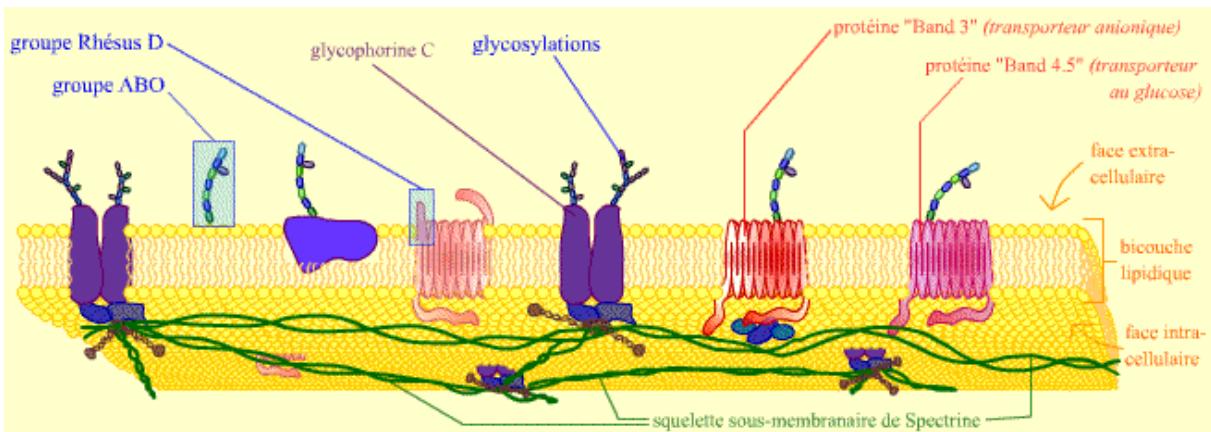


Figure 5: Ultrastructure de la membrane du globule rouge

VIII. 2. Les antigènes érythrocytaires

Les hématies comportent à leur surface des molécules membranaires capables d'être reconnues par le système immunitaire et de déclencher une réponse immune, ce sont les *antigènes membranaires érythrocytaires*. Leur nature chimique est variable : protéine, glycoprotéine (protéine + polysaccharide) ou glycolipide (lipide + oligo-polysaccharide).

Il s'agit de transporteurs et canaux membranaires (protéines assurant les transports de molécules à travers la membrane), d'enzymes, de protéines structurales de la membrane (« charpente » du globule), de molécules d'adhésions ou de récepteurs membranaires (protéines capables de lier une molécule signal ou informative). Ils sont regroupés en 29 systèmes environ. Chaque système comprend un ensemble d'antigènes allotypiques, c'est-à-dire variant d'un individu à un autre dans la même espèce, et constituent les groupes sanguins érythrocytaires. Les plus connus sont les systèmes ABO et Rhésus.

Le système ABO est le système majeur de l'immunotransfusion ; il est défini par la présence à la surface des hématies soit d'un antigène A, soit d'un antigène B, soit des deux, soit encore d'aucun d'entre eux, ce qui permet de déterminer respectivement les quatre groupes A, B, AB, et O.

Le sérum d'un sujet donné contient l'iso-anticorps naturel (anti-A ou anti-B) correspondant à l'antigène absent de ses érythrocytes ; lorsque l'hématie comporte les deux antigènes, le sérum ne contient aucun des iso-anticorps. Il contient les deux iso-anticorps anti-A et anti-B si l'hématie ne contient aucun des deux antigènes.

Les antigènes A et B sont des glycolipides répartis dans tous les tissus comme les cellules nerveuses, les os et la cornée. Ils peuvent être présents au niveau des cellules muqueuses des glandes salivaires ; et on appelle sécréteurs, les sujets possédant ces antigènes dans leur salive.

Ces antigènes du système ABO sont transmis génétiquement selon la loi de MENDEL par les gènes A, B et O du chromosome 9. En effet, il existe un substrat précurseur qui, sous l'action du fucosyl transférase du gène H, donne le substrat H ; et ce substrat H va donner les antigènes A et B sous l'action respective de la N-acéthyl galactosamine transférase et du galactosyl transférase des gènes A et B. Le groupe O est obtenu sous l'action du gène O qui n'est ni A ni B.

La substance H peut être synthétisée sous l'action du gène H sous sa forme hétérozygote (Hh) ; il est dans ce cas non transformé et pourra donc pas synthétiser les antigènes A ou B même sous l'action de leur enzyme correspondant ; il conduira ainsi au groupe O.

D'exceptionnels sujets de phénotype hh ne peuvent pas synthétiser la substance H et n'expriment donc pas d'antigènes A et B ; le phénotype ainsi défini est nommé phénotype Bombay Oh.

Ces antigènes sont des produits indirects des gènes A et B, d'où leur nature glycolipidique et non protéique. Ils sont présents chez le fœtus à la cinquième semaine et acquièrent leur expression définitive à trois ans.

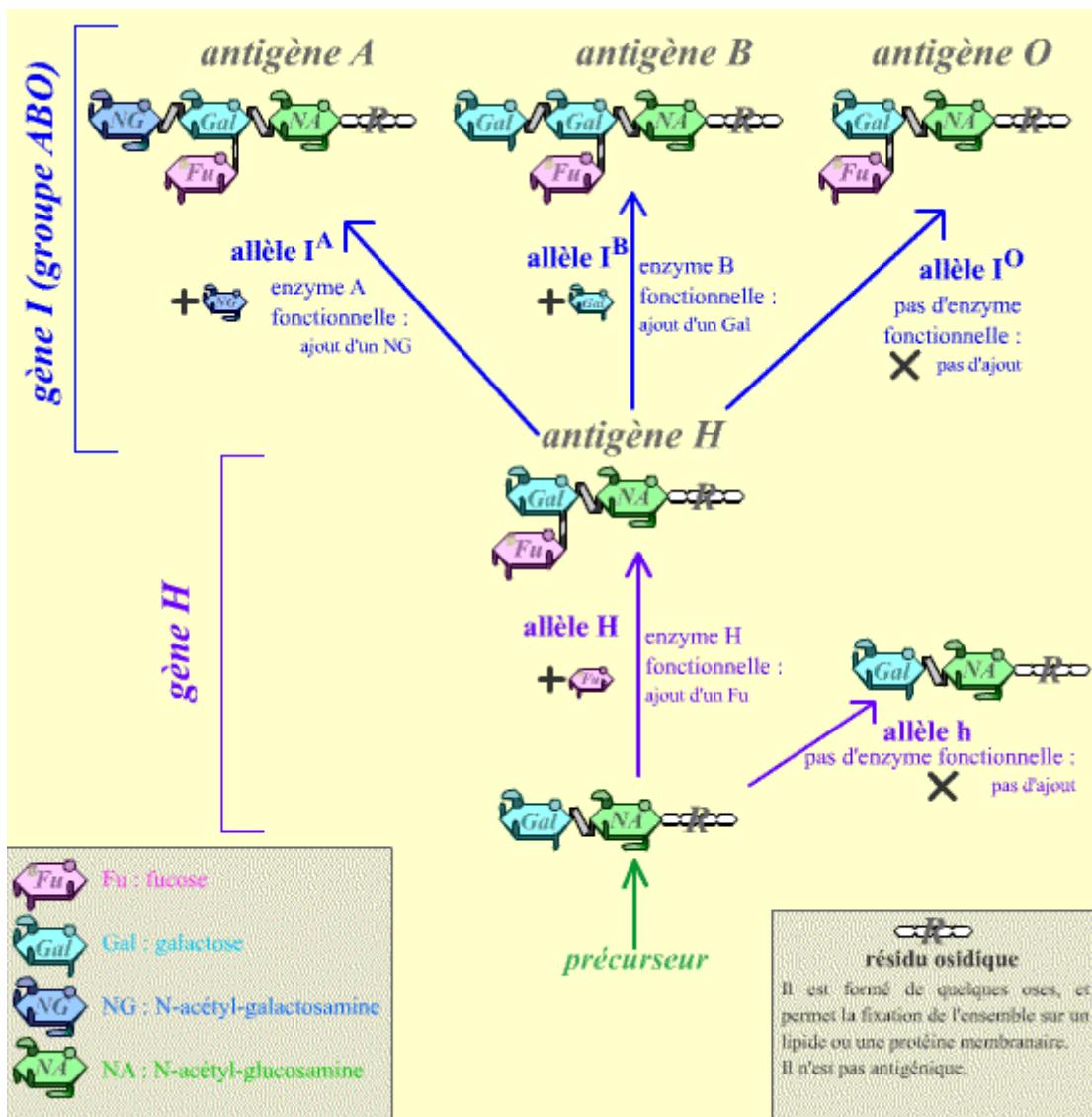


Figure 6: Antigènes ABO et polymorphisme génétique

VIII. 3. Système ABO et paludisme

Les quatre espèces de *Plasmodium* pouvant parasiter actuellement l'Homme proviennent de formes ancestrales qui datent de 200 millions d'années. [65] *P. reichenowi* est un parasite des chimpanzés relativement proche sur le plan génétique de *P. falciparum* dont il divergeait il y a 9 à 10 millions d'années, presque au même moment où les espèces préhumaines divergeaient des chimpanzés et des grands singes [65]. Par conséquent *P. falciparum* existait bien avant le développement de l'Homme moderne, ou *Homo sapiens* qui a émergé en Afrique il y a environ 200.000 ans [12; 83] et s'est développé durant une période qui se chevauche avec celle de la forme génétique actuelle de *P. falciparum*. [64]

Les Hommes ont d'abord migré hors de l'Afrique il y a 100.000 à 40.000 ans pour coloniser l'Asie, L'Europe et l'Océanie [15] et ont transporté avec eux le polymorphisme des groupes sanguins qui se sont développés sous l'influence de la pression de sélection exercée par *P. falciparum*. Durant la période allant de 70.000 à 4.000 ans plusieurs mutations au niveau de l'érythrocyte humain associées à l'avantage de survie face à l'infection à *P. falciparum* se sont développées. Ces mutations incluent les hémoglobinopathies structurales (Hb S, Hb C), [20] les hémoglobinopathies quantitatives (thalassémies) [97], les mutations au niveau de la membrane du globule rouge (spherocytose, elliptocytose, ovalocytose) [3] et les enzymopathies (déficit en G6PD). [40]

La prévalence de ces mutations sélectionnées par l'infection à *P. falciparum* en plus de la pression de *P. falciparum* exercée sur la distribution du système ABO a augmenté il y a 10.000 ans quand les décès dus au paludisme étaient considérablement élevés. [14] Cette augmentation de la prévalence résulte probablement du développement de l'agriculture, de l'éclaircissement des forêts et de la domestication des animaux. Tous ces facteurs ont promu le développement des anophèles. En conséquence la plus grande intensité de sélection due au paludisme a eu lieu au niveau du génome humain durant la période relativement courte du dernier millénaire, coïncidant avec les mutations d'adaptation observées au cours du développement.

Les gènes du système ABO et du paludisme ont eu à évoluer durant la même période. Chez l'Homme moderne, l'allèle le plus commun pour le groupe O (O01) est identique à celui du groupe A pour les 261 premiers nucléotides au niveau duquel il y a délétion d'une base de guanosine résultant d'une mutation, ce qui produit prématurément un codon stop et il n'y a pas de production d'une transférase A ou B fonctionnelle. La délétion d'une base à partir de ce qui autrement aurait été un gène fonctionnel du groupe A, implique que les individus du groupe O avec l'allèle O01 viendraient d'une mutation de l'allèle A01.

Le second allèle le plus fréquent du groupe O (O02) est considérée comme le plus ancien des allèles du groupe O et présente également la délétion à la position 261. D'autres allèles du groupe O qui sont moins fréquent ont été découverts et presque tous présentent la délétion 261. [69] Pratiquement tous les allèles du groupe O se sont développés au cours de l'évolution de l'Homme.

Parce que la délétion à la position 261 est retrouvée partout à travers le monde elle s'est probablement produite en Afrique avant les migrations des premiers Hommes. Ainsi quelque soit la pression de sélection qui a favorisé le phénotype du groupe O, elle s'est produite très tôt en Afrique il y a 50.000 à 100.000 ans. *P. falciparum* existe en Afrique depuis l'origine des Hommes modernes ce qui en fait un candidat plausible pour l'influence du développement des groupes sanguins.

De ce fait durant les 150.000 ans allant de l'origine de l'*Homo sapiens* à la migration hors de l'Afrique même un petit avantage de sélection pour le groupe O durant l'infection à *P. falciparum* a pu résulté d'une augmentation graduelle mais persistante des sujets du groupe O. Après la migration, les gènes du groupe O ont pu évoluer chez les Hommes qui vivaient en dehors de l'Afrique et ont fini par introduire la mutation indépendante du groupe O à la position 261.

En résumé quelque soit la pathologie infectieuse conduisant à la distribution des groupes sanguins ABO, elle doit être un agent actif avant les premières migrations des Hommes et devait être létale avant ou durant la vie active (ou années de reproduction). *P. falciparum* qui est considérée comme l'une des plus grandes forces de l'évolution de l'histoire a été à la bonne place et au bon moment.

I. Méthodologie

I.1. Justificatifs

Les voies d'invasion utilisées par *P. falciparum* pour parasiter les hématies restent mal connues. En effet EBA 175 considéré comme la voie principale présente un polymorphisme dans sa région centrale qui semble intervenir dans l'invasion.

L'influence des antigènes érythrocytaires dans cette invasion semble également certaine. En effet dans les pays où la prévalence du paludisme est élevée on note une forte proportion du groupe O.

Ainsi nous nous sommes fixés comme objectifs de déterminer

- la fréquence des fragments F et C du gène EBA 175
- et l'influence des groupes sanguins dans la survenue et les manifestations cliniques du paludisme à *P. falciparum*.

I.2. Cadre de l'étude

Les patients ont été recrutés dans la région de Thiès qui est située à 70 km de Dakar, dans un centre de soin et de recherche appelé Section de Lutte Anti-Parasitaire et comprenant deux unités; la parasitologie et l'entomologie.

I.3. Population d'étude

Les cas d'accès palustre sont diagnostiqués au microscope après la confection d'un frottis sanguin et/ou d'une goutte épaisse colorés au GIEMSA. Seuls les cas de paludisme simple à *Plasmodium falciparum* sont inclus dans l'étude. Lorsque le patient présente une GE positive, il lui est proposé de faire partie de l'étude. Une fiche de consentement (Annexe 1) confectionnée à cet effet et traduite en français et en wolof sera remise au patient ou à son responsable légal.

Elle est signée par le patient et par l'investigateur. Aucun prélèvement n'est effectué avant l'obtention du consentement éclairé du patient ou de son responsable légal. Pour préserver la confidentialité des inclus, un code est utilisé en guise d'identification.

I.4. Prélèvement

Le prélèvement de sang a été fait au niveau de la pulpe du doigt pour les études génétiques et au niveau de la veine du pli du coude pour la détermination du groupe sanguin.

Le sang total a été centrifugé pour récupérer le plasma à partir duquel le groupage sanguin a été réalisé.

I.5. Extraction de l'ADN de *P. falciparum*

Les extrémités contenant le sang séché sont coupées, mises dans un tube de eppendorf de 1,5 ml et mixées avec 180 ml de Buffer ATL.

Elles sont incubées à 85 °C pendant 10 minutes puis centrifugées brièvement.

On ajoutera 20 µl de protéinase K. L'ensemble est mélangé au vortex puis incubé à 56 °C pendant 1heure.

Une solution tampon appelée Buffer AL est ajoutée (200µl) puis mélangée entièrement au vortex et ensuite incubée à 70°C pendant 10 m in. Il est essentiel pour la lyse, que l'échantillon et le tampon AL soient mélangés immédiatement et complètement.

Ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) à l'échantillon et mélanger entièrement au vortex.

Avec précaution, le mélange obtenu à l'étape précédente est mis dans la colonne QIAamp (fournie par le fabricant du kit) en évitant de toucher les bords. Le bouchon est fermé, et puis le tube est centrifugé à 8000 tours pendant 1 mn. La colonne QIAamp est placée dans un nouveau tube de 2 ml tandis que le tube contenant le filtrat est jeté.

Avec précaution, le bouchon de la colonne est ouvert et on y ajoute 500 µl de Buffer AW1, en évitant de toucher les bords. Fermer le capuchon et centrifuger à vitesse maximale environ 14000 tours par minute pendant 3 minutes.

Placer la colonne QIAamp dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 ml et jeter le tube contenant le filtrat. Avec précaution, ouvrir le capuchon de la colonne et ajouter 150 ml de Buffer AE ou bien de l'eau distillée. On incubera à la température du laboratoire pendant 1 minute, ensuite on centrifugera à 8000 tours par minute pendant 1 minute.

I.6. Amplification du gène EBA-175

Elle a été réalisée par nested PCR ou PCR nichée. Les amorce et le programme utilisés sont décrits dans le tableau ci-dessous (Tableau 1). Pour la deuxième amplification, c'est l'ADN obtenu lors du premier round qui est utilisé comme matrice.

Tableau I: Programme d'amplification de EBA 175

Première amplification:	
Amorce sens : F1: 5'-CAA GAA GCA GTT CCT GAG GAA-3'	
Amorce anti sens: R1: 5'-TCT CAA CAT TCA TAT TAA CAA TTC-3'	
Deuxième amplification:	
Amorce sens: F2: 5'-CAA TTC CTC CAG ACT GTT GAA CAT-3'	
Amorce anti sens: R2: 5'-GAG GAA AAC ACT GAA ATA GCA CAC-3'	
Programme	Volume réactionnel
1. 94 °C 5mn	Go Taq 6 µl
2. 94° C 1mn	10pmol/µl sens 1 µl
3. 56°C 1mn	10pmol/µl antisens 1 µl
4. 72°C 2mn	ADN 1,5 µl
5. retour à 2 et répéter 29 fois	H ₂ O 10,5
6. 72°C 3mn	

Pour chaque prélèvement le produit de l'amplification est migré par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% puis visualisé sur une table à lumière UV après imprégnation de bromure d'ethidium.

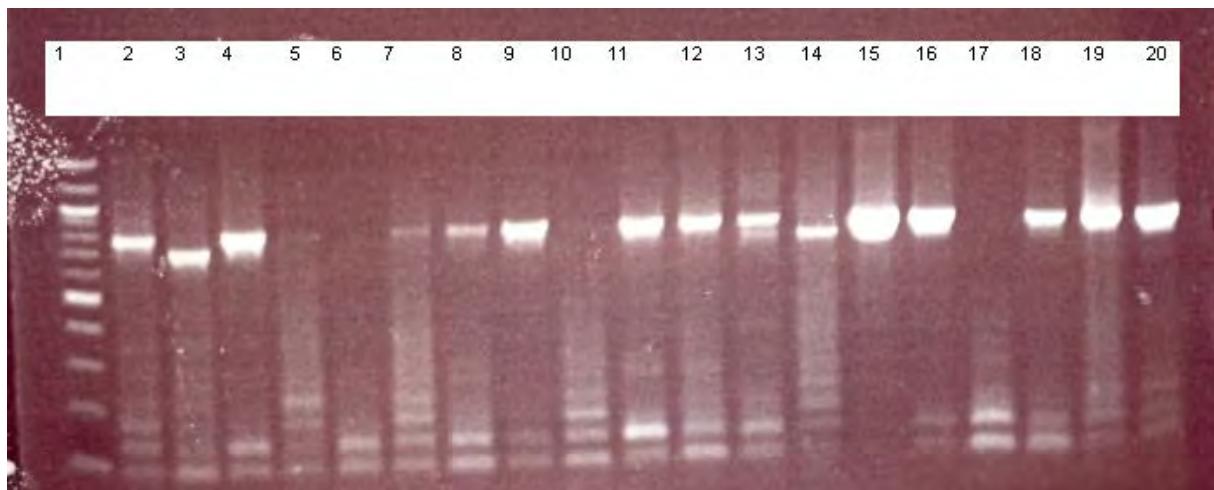


Figure 7: Visualisation au gel d'agarose de EBA 175

La colonne n° 1 r eprésente le marqueur, chaque tiret correspond à de 100 paires de bases. Il permet de déterminer la taille du produit d'amplification obtenu.

Les valeurs croissent en allant du bas vers le haut. Les colonnes 2 à 20 montrent des produits de PCR à 795 pb pour le fragment F (2-4-7-8-9-11-12-15-16-18-19-20) et à 714 pb pour le fragment C (3-14).

Le 13 présente une double infection avec la présence des deux fragments.

I.7. Détermination du groupe sanguin par la méthode de Simonin

Elle se fait par utilisation d'hématies test lavées et diluées au 1/20^{ème}.

Sur une plaque d'opaline, déposer séparément de fines gouttes d'hématies test A et B.

Distribuer une goutte de plasma du patient sur ou à coté des hématies précédemment déposées

Mélanger avec le fond d'un tube à hémolyse en l'essuyant entre chaque mélange.

Agiter les plaques par rotation.

Faire la lecture au bout de quelques minutes.

I. 8. Analyse statistique

Les données ont été saisies sur excel. Nous avons utilisé les logiciels SPSS 16.0 et STATA 9.0 pour faire les analyses statistiques. Le résultat étant considéré comme significatif si la valeur de $p < 0,05$.

II. Résultats

II. 1. Les caractéristiques de la population d'étude

Notre étude a inclus 129 patients atteints d'accès palustre simple. Au total, notre échantillon comportait 38% de femmes et 62% d'hommes.

Parmi ces patients on compte 15,5% qui ont moins de 10 ans et 84,5% âgés de plus de 10 ans.

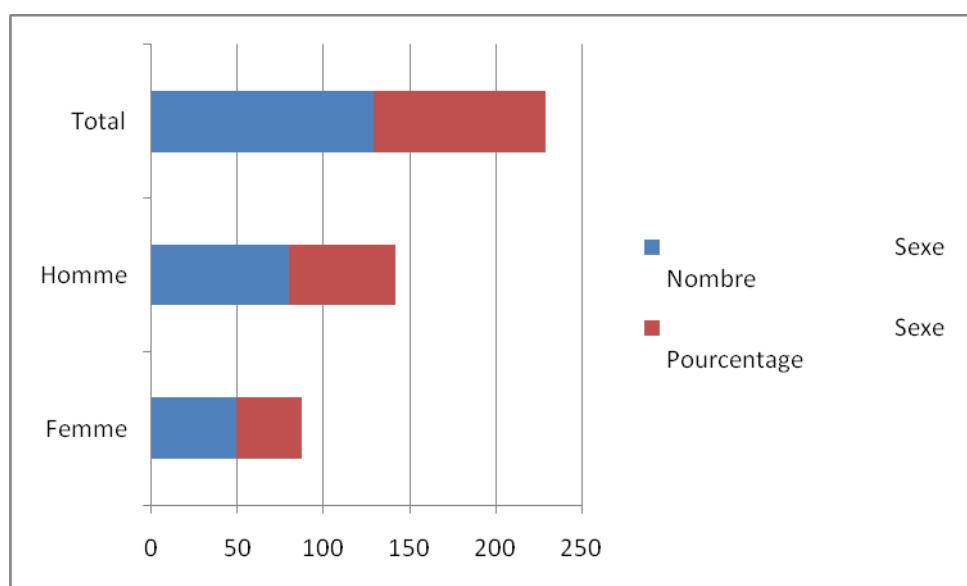


Figure 8: Distribution de la population d'étude selon le sexe

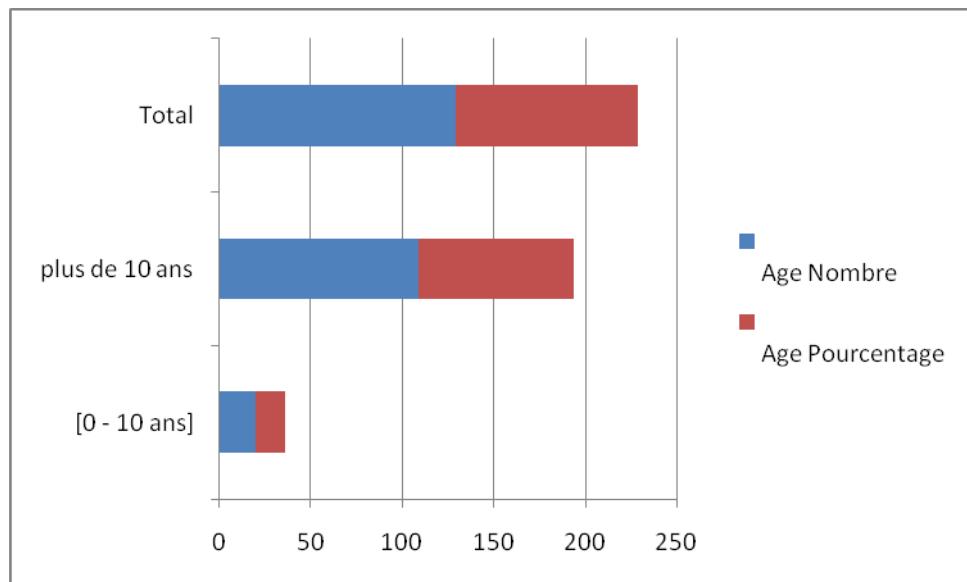


Figure 9: Distribution de la population d'étude selon l'âge

II. 2. La densité parasitaire et âge

Elle est estimée en pourcentage et varie de 0,1 à 12,5 avec une moyenne de $2,2 \pm 0,4$. Les données montrent une corrélation entre l'âge et la densité parasitaire ($p=0,011 < 0,05$ significative).

II. 3. Le génotypage de EBA 175

L'amplification a donné 129 résultats interprétables, dont 72,1% ont présenté le fragment F, 32,6% le fragment C et 4,7 une association F/C qui signe une double infection.

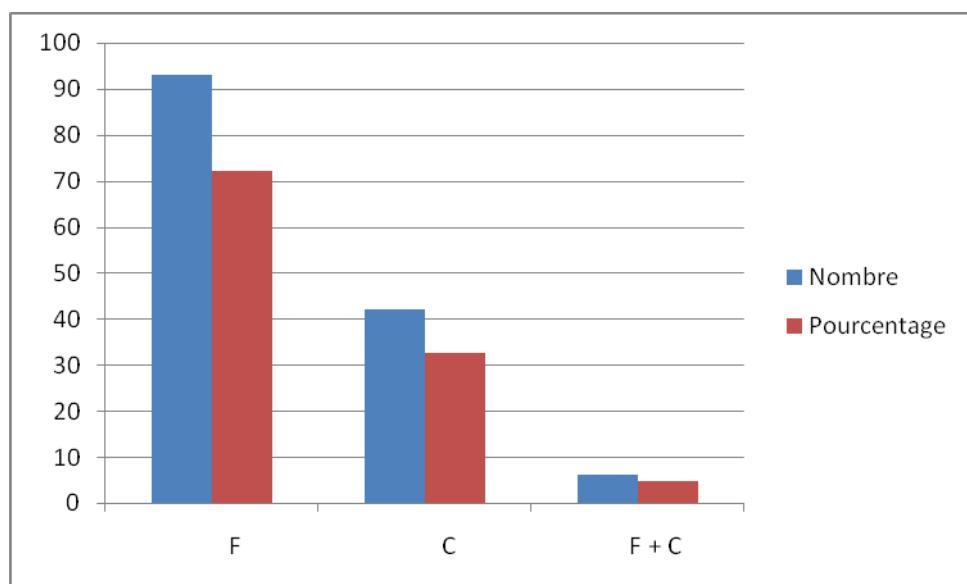


Figure 10: Résultats du génotypage de EBA 175

II. 4. La distribution des groupes sanguins

La détermination des groupes sanguins par la méthode de Simonin a montré une prédominance du groupe O avec 59,8%, suivi du groupe A avec 19,7%, du groupe B 17,2% et en dernière position le groupe AB 3,3%. Elle a été réalisée sur 122 patients.

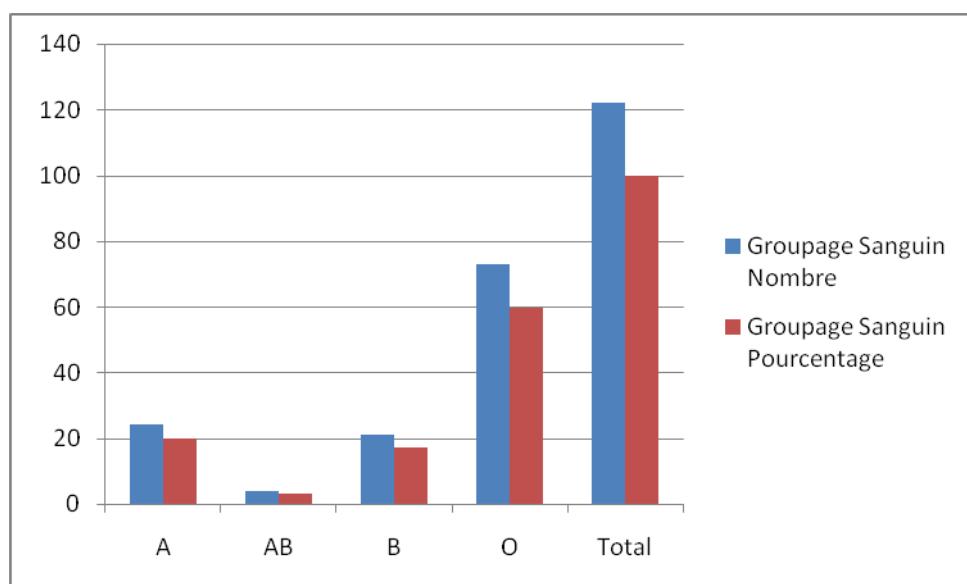


Figure 11: Répartition des groupes sanguins dans la population d'étude

II. 5. Distribution des fragments F et C selon le groupe sanguin

La distribution des fragments F et C au sein des différents groupes sanguins a été étudiée.

Dans le groupe O, le fragment F de EBA 175 est présent chez 72,6% des sujets, tandis que 32,9% ont le fragment C et 5,5% l'association F/C.

Dans le groupe A il est noté une prédominance du fragment F avec 62,5% et le fragment C représente 37,5%, l'association F/C n'est pas retrouvée.

Dans le groupe B le fragment F est présent avec 81% suivi du fragment C 28,6% et de l'association 9,5%. Le groupe AB présente 75% pour l'allèle F et 25% pour l'allèle C, l'association n'étant pas retrouvée.

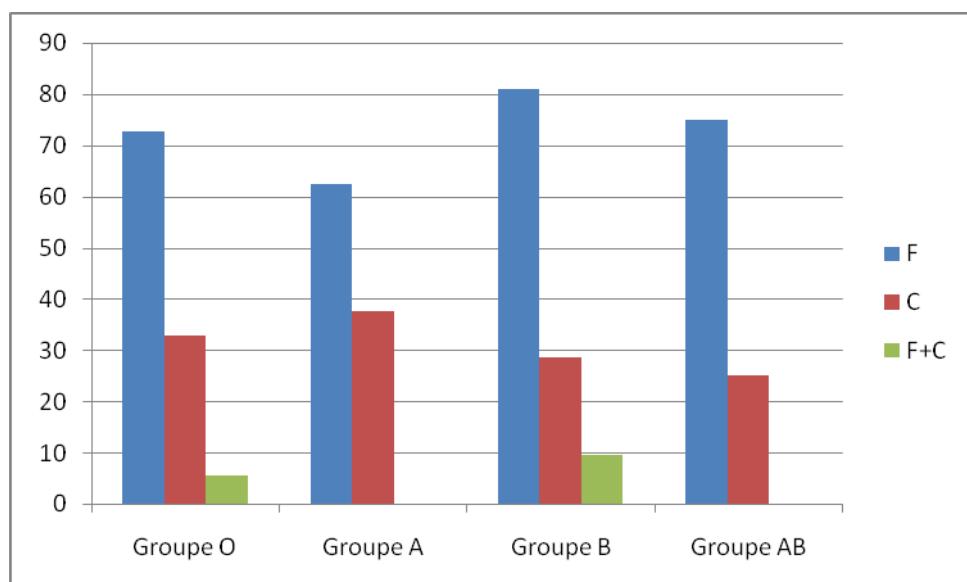


Figure 12: Distribution des fragments F et C selon le groupe sanguin

II. 6. La température corporelle et densité parasitaire

La température corporelle a été mesurée pour chaque patient à l'inclusion c'est à dire à J₀. Elle varie de 36,1°C à 41°C avec une moyenne de 38,8 ± 0,3. Aucune corrélation avec la densité parasitaire n'a été notée ($p=0,405 > 0,05$)

II. 7. Relation entre le type de fragment et l'âge

Chez les moins de 10 ans l'allèle F représente 80% et chez les plus de 10 ans 70,6%. Pour ce qui concerne l'allèle C, les moins de 10 ans représentent 20% et les plus de 10 ans 34,9%.

Les allèles du gène EBA 175 ne présentent aucune corrélation avec l'âge ($p> 0,05$)

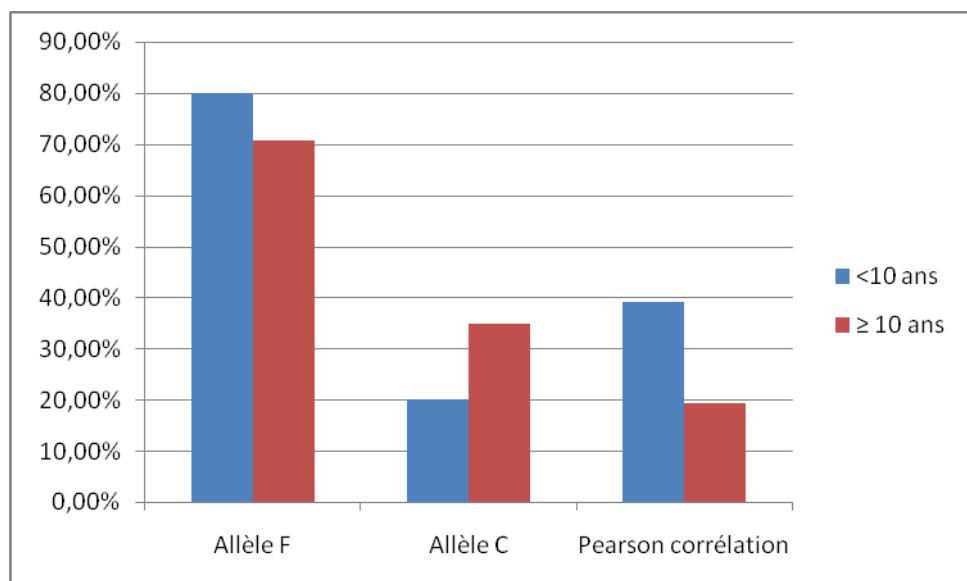


Figure 13: Distribution des allèles F et C par classe d'âge

II. 8. Relation entre le groupe sanguin et la densité parasitaire

Après avoir calculé les moyennes des densités parasitaires pour les patients des groupes A et O, nous avons constaté l'absence de différence significative en fonction du groupe sanguin ($p= 0,73$).

II. 9. Relation entre le groupe sanguin et la température

La température moyenne pour les patients du groupe O était de 39,7. Par contre celle des patients du groupe A était de 41,9. La différence de température entre les deux groupes était statistiquement significative ($p<0,001$) .

II. 10. Relation entre les allèles de EBA 175 et le sexe, la densité parasitaire, la température

Ces différents paramètres ne présentent aucune corrélation entre eux ($P> 0,05$).

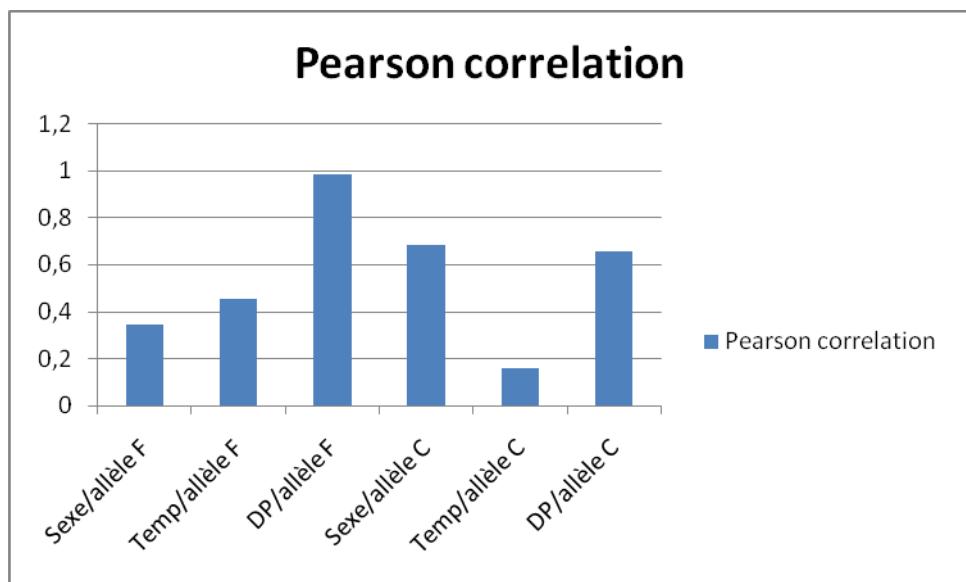


Figure 14: Relation entre les allèles F et C et le sexe, la DP et la température

III. Discussion

Notre population d'étude est composée principalement d'adultes, ceci étant certainement lié à l'existence de centres de santé et d'hôpitaux qui sont dotés de service pédiatrique. Cependant le Sénégal étant classé en zone II d'endémicité palustre, (zone de moindre transmission et de moindre résistance), l'acquisition de l'immunité est un peu plus tardive par rapport aux zones de haute transmission.

De plus l'urbanisation de l'Afrique complique davantage l'analyse du paludisme. La conséquence positive est la diminution de la transmission car les conditions sont plus favorables aux gîtes larvaires des *Culex* et non aux *Anophèles*. Mais le revers de la médaille est une augmentation de l'incidence des formes graves suite à un contact moins fréquent avec le parasite d'où une réduction de l'immunité protectrice.

La densité parasitaire a été évaluée en pourcentage. Les données montrent une corrélation entre l'âge et la densité parasitaire ($p = 0,011$). En effet dans les régions où la transmission est intense, il s'établit progressivement chez l'homme un état de tolérance au parasite qui se traduit par des modifications de la susceptibilité parasitologique et clinique des individus, en fonction de l'âge [68 ; 69]. Cette immunité présente la particularité de ne pas être stérile, puisque des parasites demeurent détectables dans le sang. Elle semble donc être liée au fait que les individus acquièrent la capacité de juguler la multiplication des parasites et ainsi éviter les symptômes de la maladie dus à une augmentation excessive de la charge parasitaire. [68 ; 87]

Ce phénomène appelé prémunition est décrit depuis 1935 par Sergent et al [76]. Sa caractéristique majeure est qu'elle est lente à s'établir et semble dépendre d'une exposition régulière du parasite au système immunitaire. L'absence d'infection pendant plus d'un an suffit pour la perdre et rendre ainsi le sujet à nouveau susceptible de présenter un accès clinique. [68] C'est aussi une immunité spécifique d'espèce et de souche, bien qu'une protection partielle contre des souches hétérologues fut notée. [87] Une étude longitudinale portant sur plusieurs enfants et menée dans un village holoendémique de la région de Fatick, Dielmo, montre que chaque nouvel accès clinique coïncide avec la présence de nouvelles populations parasitaires génétiquement distinctes. Certains enfants sont capables de contrôler la croissance de certaines souches qui sont alors hébergées sans signes cliniques, mais non d'autres qui entraînent des accès. [16; 68]

Par ailleurs il n'existe aucune association entre la densité parasitaire et la température corporelle ($p = 0,405$).

Les sujets du groupe O sont majoritairement représentés dans notre population d'étude, ce qui corrobore les résultats retrouvés dans la littérature. En effet dans les zones où le paludisme sévit on note une prédominance du groupe O alors que dans les pays non endémiques c'est le groupe A qui prédomine. Au Sénégal, le groupe O a une prévalence de 50% contre 25% pour le groupe A [Données non publiées].

L'hypothèse qui est avancée est que le groupe O offre un avantage de survie, le groupe A un inconvénient et le groupe B a un effet intermédiaire. Selon cette hypothèse on s'attend à avoir un ratio O/A plus élevé dans les régions où le paludisme sévit ou a sévi à l'état endémique. En effet c'est ce que montre la distribution des groupes sanguins. Spécialement on note une grande prévalence du groupe O associée à une faible prévalence du groupe A en Afrique au Sud du Sahara où *P. falciparum* est toujours à l'état endémique.

Au niveau de la partie ouest de l'hémisphère nord, la distribution des groupes O et A montre généralement celle du paludisme. [36] A partir régions tropicales du centre et du sud de l'Amérique en allant vers le sud, les autochtones sont presque exclusivement du groupe O. En Asie, la prévalence du groupe O augmente dans la population qui vit près de l'équateur. Par exemple en Chine, à Beijing qui est une région froide le groupe O représente 29% et le groupe A 27%, alors qu'à Canton qui est une zone tropicale le groupe O est de 46% et le groupe A, de 23%. Le groupe O est par ailleurs prédominant en Turquie et en Perse. [36]

Par contre, le groupe A est prédominant dans les régions froides de la planète qui sont indemnes de paludisme. De ce fait il est retrouvé avec une grande fréquence en Scandinavie, au Groenland et dans les régions subarctiques de l'Europe et de l'Amérique du Nord. Ainsi, si la protection contre le paludisme est associée au groupe O et la mortalité au groupe A, alors la distribution des groupes sanguins ABO est la conséquence de la pression de sélection exercée par le paludisme.

Notre étude montre une relation particulière entre la température corporelle et les groupes sanguins O et A. En effet, la moyenne de la température des sujets du groupe O était inférieure à celle des patients du groupe A ($p < 0,001$). Ce qui suggère l'hypothèse selon laquelle le groupe O est protecteur. Une étude conduite au Sri Lanka a montré que les sujets du groupe O présentaient moins de cas de paludisme sévère par rapport à ceux des autres groupes [57]. En Gambie, une autre étude a montré que le poids de naissance des nouveau-nés de mères appartenant au groupe O dont le placenta est infecté par *P. falciparum* était supérieur à ceux dont les mères étaient du groupe non O. [44]

Le génotypage de l'Erythrocyte Binding Antigen 175 dans notre population d'étude a montré une prédominance du fragment F avec 72,1%, 32,6% pour le fragment C et

l'association 4,7%. Dittrich et al ont également trouvé une prédominance du fragment F dans une étude au Laos. [21] Binks et al ont également trouvé une prédominance du fragment F dans quatre pays que sont le Nigéria, la Gambie, le Gabon et l'Afrique du Sud. [9] Cependant au Soudan on note une prédominance du fragment C. [9] D'après Binks et al [9] les différences génétiques au niveau des populations humaines qui hébergent le parasite, pourraient entraîner une sélection de ces allèles. Cependant d'autres études sur une population plus grande sont nécessaires pour comprendre la distribution des allèles de EBA 175. La plus grande densité parasitaire a été notée chez un patient qui présente le fragment F, mais les plus faibles densités parasitaires sont retrouvées aussi bien chez les sujets présentant l'allèle F que C.

La répartition des allèles de EBA 175 selon le groupe sanguin montre une prédominance du fragment F. Les sujets du groupe O présentent une fréquence des fragments qui est très proche de celle de la population d'étude globale. Dans le groupe AB, l'association qui signe une double population parasitaire n'est pas retrouvée mais ceci peut être dû à sa faible représentation (moins de 5% de l'échantillon).

Aucune corrélation n'est notée entre les allèles du gène EBA 175 et les différents paramètres tels que l'âge, le sexe, la densité parasité et les groupes sanguins, ce qui corrobore les résultats de Dittrich et al. 2003. [21]

Conclusion

Malgré la connaissance du paludisme depuis l'antiquité, les pertes en vies humaines demeurent toujours stupéfiantes. Ceci témoigne de la complexité de ce parasite avec ses différents stades rendant très difficile la mise au point d'un vaccin antipaludique qui semble être la seule alternative vu les phénomènes de résistance aux médicaments. De ce fait il est primordial de connaître les voies utilisées par les merozoites pour parasiter les globules rouges et pouvoir ainsi bloquer son entrée.

La prévalence des sujets du groupe O dans les zones à forte endémicité palustre suscite beaucoup de questions et en dépit d'une grande littérature l'évolution basée sur l'origine et la diversité des antigènes du groupe O reste incertaine.

Devant une telle situation nous nous sommes proposés d'étudier la distribution des deux allèles de EBA 175 et de montrer une possible relation entre les groupes sanguins et le paludisme chez des patients atteints de paludisme simple à *P falciparum* dans la région de Thiès. Pour ce faire il a été réalisé un recrutement de malades, durant la période de septembre à novembre 2007.

Notre étude a montré sur le plan moléculaire, une plus grande fréquence de l'allèle F du gène EBA 175 chez les souches parasitaires circulant dans la région de Thiès. Une prédominance du groupe O a été également retrouvée dans la population. Cependant aucune corrélation n'a été notée entre ces allèles et les groupes sanguins.

Les sujets du groupe O faisaient moins de fièvre que ceux du groupe A.

Il y a une corrélation entre l'âge et la densité parasitaire, témoignant de l'existence d'une prémunition. Il s'agit d'un état de tolérance au parasite qui se traduit par des modifications de la susceptibilité parasitologique et clinique des individus en fonction de l'âge. En effet les sujets ayant acquis cette prémunition ne présentent que rarement les symptômes de la maladie et lorsque c'est le cas ceux-ci sont atténus.

Aucune corrélation n'a été notée entre les allèles de EBA 175 et l'âge, la température, la densité parasitaire et le sexe.

Au terme de ce travail nous constatons qu'il serait judicieux de mener cette étude dans plusieurs régions du Sénégal pour mieux cerner la distribution de ces allèles dans la population.

Pour mieux comprendre les relations pouvant exister entre le paludisme et le système ABO, une étude plus approfondie et incluant un plus grand nombre d'échantillons reste nécessaire.

RESUME

Prénoms & Nom du candidat: **Aïda Sadikh BADIANE**

Nature du mémoire: **Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie Animale**

Président: **Ben Sikina TOGUEBAYE (Professeur UCAD, FST)**

Jury: **Mr Omar NDIR (Professeur, UCAD, FMPOS)**

Mr Souleymane MBOUP (Professeur, UCAD, FMPOS)

Mr Lansana KONATE (Maître assistant, UCAD, FST)

Soutenu le: 18 juillet 2008

Résumé: Depuis plus de cent ans après l'identification du *Plasmodium* par Laveran, la mortalité et la morbidité dues au paludisme ne cessent d'augmenter. La solution idéale contre ce fléau serait le développement d'un vaccin qui agirait avant l'envahissement des érythrocytes par les merozoites. Ceci nécessite une meilleure compréhension des voies d'invasion.

L'Erythrocyte Binding Antigen 175 est un antigène de *P falciparum* jouant un rôle majeur dans la reconnaissance de l'érythrocyte par le parasite. Il est supposé être en partie responsable de l'invasion des érythrocytes par les merozoites. Cependant plusieurs facteurs semblent intervenir, ainsi l'influence du système sanguin ABO dans la survenue ou les manifestations cliniques du paludisme suscite beaucoup d'intérêt.

Pour mieux comprendre ces différentes relations nous avons étudié la distribution des allèles F et C de la région III de EBA 175 et l'influence des groupes sanguins chez des patients atteints de paludisme simple à *P falciparum* dans la région de Thiès.

Les malades ont été recrutés sur la base d'une goutte épaisse positive. Il a été réalisé une amplification du gène EBA 175 et un groupage sanguin.

Le génotypage a montré une plus grande fréquence de l'allèle F avec 72,1% alors que l'allèle C représente 32,6% et l'association qui signe une double infection a été retrouvée dans 4,7% des cas.

La distribution des groupes sanguins est de 59,8% pour le groupe O, 19,7% pour le groupe A, 17,2% pour le groupe B et 3,3% pour le groupe AB.

Une corrélation entre l'âge et la densité parasitaire a été notée témoignant de l'existence d'une prémunition.

Aucune corrélation n'a été notée entre les allèles de EBA 175 et l'âge, la température, la densité parasitaire, le sexe ou les groupes sanguins.

Par contre nous avons trouvé que les sujets du groupe O faisaient moins de fièvre que ceux du groupe A.

Pour une meilleure compréhension de la distribution de ces allèles et des relations pouvant exister entre le paludisme et le système ABO, une étude plus approfondie et incluant un plus grand nombre d'échantillons reste nécessaire.

Mots clés: *Plasmodium falciparum*, Erythrocyte Binding Antigen, Système ABO, Invasion érythrocytaire.

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Adams JH, Blair PL, Kaneko O and Peterson DS.** 2001
An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*.
Trends Parasitol 17: 297-299.
- 2. Aikawa M, Miller LH, Johnson J and Rabbege J.** 1978
Erythrocyte entry by malaria parasite
J Cell Biol 77:72-88.
- 3. Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND and al.** 1990
Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by Southeast Asian ovalocytosis band 3.
Am J Trop Med Hyg. 60:1056-1060.
- 4. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Bluter H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA and Hill DP.** 2000
Gene ontology: tool of the unification of biology.
Nature Genet. 25:25-29.
- 5. Athreya BH and Coriell LL.** 1967
Relation of blood groups to infection: I. A survey and review of data suggesting possible relationship between malaria and blood groups.
Am J Epidemiol. 86:292-304.
- 6. Babiker HA, Pringle SJ, Abdel-Muhsin A, Mackinnon M, Hunt P and Walliker D.** 2001
High-level chloroquine resistance in Sudanese isolates of *Plasmodium falciparum* is associated with mutations in the chloroquine-resistance transporter genes PfCRT and the multidrug resistance Gene PfMDR1.
J Infect Dis 183:1535-1538.
- 7. Baum J, Pinder M and Conway DJ.** 2003
Erythrocyte invasion phenotypes of *Plasmodium falciparum* in the Gambia . *Infect Immun.* 71:1856-1863.

8. Biggs BA, Kemp DJ and Brown GV. 1989

Subtelomeric chromosome deletions in field isolates of *Plasmodium falciparum* and their relation ship, to loss of cytoadherence in vitro

PNAS ; 86: 2428-2432.

9. Binks RH, Baum J, Oduala AMJ, Arnaud E, Babiker HA, Kremsner PG, Roper C, Greenwood BM and Conway DJ. 2001

Population genetic analysis of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 155 (eba-175) gene

Mol Biochem Parasitol. 114:63-70.

10. Binks RH and Conway DJ. 1999

The major allelic dimorphisms in four *Plasmodium falciparum* merozoites proteins are not associated with alternative pathways of erythrocyte invasion.

Mol Biochem Parasitol. 103:123-127.

11. Bowman S, Lawson D, Basham D, Chillingworth T, Churcher CM, Craig A, Davies RM, Devlin K and Feltwell T. 1999

The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*.

Nature 400: (6744) 532-538.

12. Cann RL, Stoneking M and Wilson AC. 1987

Mitochondrial DNA and human evolution.

Nature. 325:31-36.

13. Cappai R, Van Schravendijk MR, Anders RF, Peterson MG, Thomas ML, Cowman AF & al. 1989

Expression of RESA gene in *Plasmodium falciparum* isolate FCR₃ is prevented by a subtelomeric deletion

Mol Cell Biol 9:3584-3587.

14. Carter R & Mendis KN. 2002

Evolutionary and historical aspects of the burden of malaria.

Clin Micro Rev. 15:564-594.

15. Cavalli-Sforza LL & Feldman MW. 2003

The application of molecular genetic approaches to the study of human evolution.

Nat Genet 33:266-275.

16. Contamin H, Fandeur T, Rogier C, Bonnefoy S, Konate L, Trape JF, and Mercereau Pujalon O. 1996

Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children.

Am J Trop Med Hyg. 54:632-643.

17. Corcoran LM, Forsyth KP, Bianco AE, Brown GV and Kemp DJ. 1986

Chromosome size polymorphisms in *Plasmodium falciparum* can involve deletions and are frequent in natural parasite population.

Cell 44:87-95.

18. Daugherty JR, Murphy CI, Doros-Richert LA, Barbosa A, Kashala LO, Ballou WR & al. 1997

Baculovirus-mediated expression of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175 polypeptides and their recognition by human antibodies.

Infect Immun. 65:3631-7.

19. Day K P, Karamalis F, Thompson J, Barnes DA, Peterson C, Brown H & al. 1993

Genes necessary for expression of a virulence determinant and for transmission of *Plasmodium falciparum* are located on a 0.3-megabase region of chromosome 9.

PNAS. 90:8292-8296.

20. Desai DV & Dhanani H. 2004

Sickle Cell Disease : History and origin.

J Hematol. 1:599-600.

21. Dittrich S & al. 2003

Distribution of the two forms of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen (eba 175) gene in Lao PDR.

Malaria Journal. 2:23.

22. Dolan SA, Miller LH & Wellems TE. 1990

Evidence for a switching mechanism in the invasion of erythrocyte by Plasmodium falciparum.

J Clin Invest. 86: 618-624.

23. Dolan SA, Proctor JL, Alling DW, Okubo Y, Wellems TE & al. 1994

Glycophorin B as an EBA 175 independent Plasmodium falciparum receptor of human erythrocytes.

Mol Biochem Parasitol. 64: 55-63.

24. Duraisingh MT, Maier AG, Triglia T & Cowman AF. 2003

Erythrocyte binding Antigen 175 mediates invasionin Plasmodium falciparum utilizing sialic acid-dependentand independent pathways.

Proc Natl Acad Sci USA 100: 4796-4801.

25. Duraisingh MT, Triglia T, Ralph SA, Rayner JC, Barnwell JW & al. 2003

Phenotypic variation of Plasmodium falciparum merozoite proteins directs receptor targeting for invasion of human erythrocytes.

EMBOJ 22: 1047-1057.

26. Duret L. 2000

t-RNA gene number and codon usage in the C.elegans genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes.

Trends Genet 16:287-289.

27. Friedman MJ, Blankenberg T, Sensabaugh G & Tenforde TS. 1984

Recognition and invasion of human erythrocytes by malarial parasites : contribution of sialoglycoproteins to attachment and host specificity.

J Cell Biol 98:1672-1677.

28. Galinski MR, Medina CC, Ingravallo P & Barnwell JW. 1992

A Reticulocyte binding protein complex of Plasmodium vivax merozoites

Cell 69:1213-1226.

29. Gallup JL and Sachs JD. 2001

The economic burden of malaria.

Am J Trop Med Hyg 64 (1-2 Suppl): 85-96

30. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M & al. 2002

Genome sequence of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*.

Nature 419:498-511.

31. Gaur D, Mayer DC & Miller LH. 2004

Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *plasmodium* merozoites.

Int J Parasitol 34:1413-1429.

32. Gaye O, Faye O, Bah IB, Diallo S, Diouf M, Ndiaye P, Ndiaye AA & Trape JF. 1991

Development of chloroquine resistance in an urban area. Results of surveys in Dakar and Pikine.

Ann Soc Belg Med Trop 71:329-30.

33. Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T, Good RT, Duraisingh MT & al. 2003

A novel erythrocyte binding antigen-175 paralog from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes.

J Biol Chem 278: 14480-14486.

34. Hernandez RR, Hinterberg K & Scherf A. 1996

Compartmentalization of genes coding for immunodominant antigens to fragile chromosome ends leads to dispersed subtelomeric gene families and rapid gene evolution in *Plasmodium falciparum*.

Mol Biochem Parasitol 78: 137-148.

35. Hinterberg K, Mattei D, Wellemes TE & Scherf A. 1994

Interchromosomal exchange of a large subtelomeric segment in a *plasmodium falciparum* cross.

EMBO J. 13: 4174-4180.

36. http://anthro.palomar.edu/vary_3.htm. Accessed 27 july 2007

37. Kain KC, Orlandi PA, Haynes JD, Sim BKL and Lanar DE. 1993

Evidence for two stage binding by the 175-kD erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum*.

J Exp Med 178:1497-1505

38. Kaneko O, Mu J, Tsuboi T, Su X & Torii M. 2002

Gene structure and expression of a *Plasmodium falciparum* 220-KDa protein homologous to the *Plasmodium vivax* reticulocyte binding proteins.

Mol Biochem Parasitol 121: 275-278.

39. Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F & Prensier G. 2001

Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*.

Nature 414: 450-453.

40. Kay AC, Kuhl W, Prchal J & Beutler E. 1992

The origin of glucose-6-phosphate-deshydrogenase (G6PD) polymorphisms in African-Americans.

Am J Hum Genet 50:394-398.

41. Kevin CK and David L. 1991

Determination of genetic variation within *Plasmodium falciparum* by using enzymatically amplified DNA from filter papers disks impregnated with whole blood

J Clin Microbiol 29 :1171-1171.

42. Lanzer M, Wetheimer SP, de Bruin D and Ravetch JV. 1994

Chromatin structure determines the sites of chromosome breakages in *Plasmodium falciparum*

Nucleic Acids Res 22: 3099-3103.

43. Liang H & Sim BKL. 1997

Conservation of structure and function of the erythrocyte binding domain of Plasmodium falciparum EBA 175.

Mol Biochem Parasitol 84:241-5.

44. Loscertales MP, Brabin BJABO. 2006

Phenotypes and malaria related outcomes in mother and babies in The Gambia: a role for histo-blood groups in placental malaria?

Malaria J 5:1-6.

45. Louis E J, Naumova E S, Lee A, Naumov G & Haber J E. 1994

The chromosome's end in yeast: its mosaic nature and influence on recombination dynamics.

Genetics 136: 789-802.

46. Maier AG, Duraisingh MT, Reeder JC, Patel SS, Kazura JW & al. 2003

Plasmodium falciparum erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for gerbich negativity in human population

Nat Med 9: 87-92

47. Mattei D and Scherf A. 1994

Subtelomeric chromosome instability in *Plasmodium falciparum*: short telomere-like sequence motifs found frequently at headed chromosome breakpoints

Mutat Res 324:115-120.

48. Mayer DC, Kaneko O, Hudson Taylor DE, Reid ME & Miller LH. 2001

Characterization of a Plasmodium falciparum erythrocyte binding protein paralogous to EB 175 .

PNAS 98 : 5222-5227

49. Miller LH, Haynes JD, Mc Auliffe FM, Shiroishi T, Durocher JR & al. 1977 Evidence for differences in erythrocyte surface receptors for the malarial parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium knowlesi.

J Exp Med 146: 277-281.

50. Ministère de la santé. 2001

Plan stratégique pour faire reculer le paludisme au Sénégal 2001-2005.

Programme national de lutte contre le paludisme, Dakar (Sénégal)

51. Mitchell GH, Hadley TJ, Mc Ginniss MH, Klotz FW & Miller LH. 1986

Invasion of erythrocytes by Plasmodium falciparum malaria parasites : evidence for receptor heterogeneity and two receptors.

Blood 67:1519-1521.

52. Mitchell GH and Bannister LH. 1988

Malaria parasite invasion : interactions with the red cell membrane

Crit Rev Oncol Hematol 8:225-310.

53. Moriyama E N & Powell J R. 1997

Codon usage, bias and t-RNA abundance in Drosophila.

J Mol Evol 45 514-523.

54. Okenu DMN, Riley EM, Bickle QD, Agomo PU, Barbose A, Dauherty JR, Lanar DE and Conway DJ. 2000

Analysis of human antibodies to erythrocyte binding antigen 175 of Plasmodium falciparum

Infect Immun 68 :5559-5566.

55. Okoyeh JN, Pillai GR & Chitnis CE. 1999

Plasmodium falciparum field isolates commonly used erythrocyte invasion pathways that are independent of sialic acid residues of glycophorin A.

Infect Immun 67: 5784-5791.

56. Pasvol G, Wainscoat JS & Weatherall DJ. 1982

Erythrocytes deficiency in glycophorin resist invasion by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*.

Nature 297: 1941-1944.

57. Pathirane SL, Alles HK, Bandara S and al. 2005

ABO blood-group types and protection against *Plasmodium falciparum* severe malaria.

Ann Trop Med Parasitol 99:119-124.

58. Perkins M. 1981

Inhibitory effects of erythrocyte membraneproteins on the in vitro invasion of the human malarial parasite (*Plasmodium falciparum*) into its host cell.

J Cell Biol 90:563-567.

59. Perkins ME & Holt EH. 1988

Erythrocyte receptor recognition varies in *Plasmodium falciparum* isolates.

Mol Biochem Parasitol 27:23-34.

60. Pologe LG and Ravetch JV. 1988

Large deletions result from breakage and healing of *Plasmodium* chromosome:

Cell 55:869-874.

61. Pologe LG & Ravetch JV. 1986

A chromosomal rearrangement in a *P falciparum* histidine-rich protein gene is associated with the knobless phenotypes.

Nature 322:474-477.

62. Pologe LG, de Bruin D and Ravetch JV. 1990.

A and T homopolymeric stretches mediate a DNA inversion in *Plasmodium falciparum* which results in loss of gene expression.

Mo Cell Biol 10:3243-3246.

63. Rayner JC, Galinski MR, Ingravallo P & Barnwell JW. 2000

Two Plasmodium falciparum genes express merozoite proteins that are related to Plasmodium vivax and Plasmodium yoelii adhesive proteins involved in host cell selection and invasion.

Proc Natl Acad Sci USA 97 : 9648-9653.

64. Rayner JC, Vargas-Serrato E, Huber CS, Galinski MR, Barnwell JW& al. 2001

A Plasmodium falciparum homologue of plasmodium vivax reticulocyte binding protein (Pv RBP1) defines a trypsin-resistant erythrocyte invasion pathway.

J Exp Med 194: 1571-1581.

65. Reed MB, Caruana SR, Batchelor AH, Thompson JK, Crabb BS & al. 2000

Targeted disruption of an erythrocyte binding antigenin Plasmodium falciparumis assiciated with a switch toward a sialic acid-independent pathway of invasion.

Proc Natl Acad Sci USA 97 : 7509-7514.

66. Rich SM & Ayala FJ. 1998

The recent origin of allelic variation in antigenic determinants of Plasmodium falciparum.
Genetics 150:515-517.

67. Rich SM & Ayala FJ. 2006

Evolutionary Origins of Human Malaria Parassites. In : Dronamraju KR, Arese P, eds.
Malaria : Genetics and Evolutionary Aspects.
Springer: New York 125-146.

68. Rogier C et Trape JF. 1995

Etude de l'acquisition de la prémunitiion en zone d'holo et de méso endémicité
Med Trop 55 :759-765.

69. Rogier C. 1998

Etude de l'histoire naturelle du paludisme à *Plasmodium falciparum* et des déterminants de l'acquisition de l'immunité antipalustre en zone de forte endémie, village de Dielmo, Sénégal.
Thèse de Doctorat ès sciences, Université de Bordeaux p 242.

70. Roos DS, Crawford MJ, Donald RG, Kissinger JC, Klimczak LJ & Striepen B. 1999
Origin, targeting, and function of the apicomplexan plastid.
Curr Opin Microbiol 2: 426-432.

71. Roubinet F, Despiau F, Calafell F & al. 2004
Evolution of the alleles of the human ABO blood group gene.
Transfusion 44: 707-715.

72. Rudenko G, McCulloch R, Dirks-Mulder A & Borst P. 1996
Telomere exchange can be an important mechanism of variant surface glycoprotein gene switching in *Trypanosoma brucei*.
Mol Biochem Parasitol 80: 65-75.

73. Sachs J & Malaney P. 2002
The economic and social burden of malaria.
Nature 415 (6872) : 680-685.

74. Scherf A, Carter R, Petersen C, Alano P, Nelson R & Pereira da Silva L. 1992
Gene inactivation of Pf11-1 of *Plasmodium falciparum* by chromosome breakage and healing: identification of a gametocyte-specific protein with a potential role in gametocytogenesis.
EMBO J. 11:2293-2301.

75. Scherf A and Mattei D. 1992
Cloning and characterization of chromosome breakpoints of *Plasmodium falciparum*: breakage and new telomere formation occurs frequently and randomly in subtelomeric genes.
Nucleic Acids Res 20: 1491-1496.

76. Sergent E, Parrot L et Donatien A. 1935
Une question de terminologie: immuniser ou prémunir.
Bull Soc Path Exot. 17:30-35.

77. Shirley MW, Biggs BA, Forsyth KP, Brown HJ, Thomson JK, Brown GV & al. 1990
Chromosome 9 from independent clones and isolates of *Plasmodium falciparum* undergoes
subtelomeric deletions with similar breakpoints *in vitro*

Mol Biochem Parasitol 40 : 137-145.

78. Sim BK, Chitnis EC, Wasniowska K, Hadley TJ & Miller LH 1994

Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*.

Science 264: 1941-1944.

79. Sim BK, Orlandi PA, Haynes JD, Klotz FW, Carter JM & al. 1990

Primary structure of the EBA 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion.

J Cell Biol 111: 1877-1884.

80. Sim BKL. 1990

Sequence conservation of a functional domain of erythrocyte binding antigen 175 in *Plasmodium falciparum*.

Mol Biochem Parasitol 41:293-6.

81. Sim BKL. 1995

EBA-175 an erythrocyte binding ligand of *Plasmodium falciparum*

Parasitol Today 11:213-217.

82. Tan TH, Pach R, Crausaz A, Ivens A & Schneider A. 2002

tRNAs in *Trypanosoma brucei*; genomic organization, expression, and mitochondrial import.

Mol. Cell. Biol 22 3707-3717.

83. Tarassov IA & Martin RP. 1996

Mechanisms of tRNA import into yeast mitochondria: an overview.

Bioch 78:502-510.

84. Taylor HM, Triglia T, Thompson J, Sajid M, Fowler R & al. 2001

Plasmodium falciparum homologue of the gene for Plasmodium vivax and P yoelii adhesives proteins which is transcribed but not translated.

Infect Immun 69: 3635-3645.

85. The Y chromosome consortium. 2002

A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups.

Genome Res. 12 : 339-348.

86. Thompson JK, Triglia T, Reed MB & Cowman AF. 2001

A novel ligand from Plasmodium falciparum that binds to a sialic acid-containing receptor on the surface of human erythrocytes.

Mol Microbiol 41: 47-58.

87. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, Legros F, Badji A, Ndiaye G, Ndiaye P & al. 1994

The Dielmo project : a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal.

Am J Trop Med Hyg. 51:123-37.

88. Triglia T, Duraisingh MT, Good MT & Cowman AF. 2005

Reticulocyte binding homologue 1 is required for sialic acid-dependent invasion into human erythrocytes by Plasmodium falciparum.

Mol Microbiol 55:162-174.

89. Triglia T, Thompson JK & Cowman AF. 2001

An EBA 175 homologue which is transcribed but not translated in erythrocytic stages of Plasmodium falciparum.

Mol Biochem Parasitol 116: 55-63

90. Vaidya AB, Akella R & Suplick K. 1989

Sequences similar to genes for two mitochondrial proteins and portions of ribosomal RNA in tandemly arrayed 6-kilobase-pair DNA of a malaria parasite.

Mol Biochem Parasitol 35: 97-107.

91. Vaidya AB, Lashgari MS, Pologe LG & Morrisey J. 1993

Structural features of Plasmodium cytochrome b that may underlie susceptibility to 8-aminoquinolines and hydroxynaphthoquinones.

Mol Biochem Parasitol 58: 33-42.

92. Waller RF, Reed MB, Cowman AF & McFadden GI. 2000

Protein trafficking to the plastid of Plasmodium falciparum is via the secretory pathway.
EMBO J. 19: 1794-1802.

93. Walliker D, Quakyi IA, Wellems TE, Mc Cutchan TF, Szafrman A, London WT & al. 1987

Genetic analysis of the human malaria parasite Plasmodium falciparum: Science, v 236 p 1661-1666.

Mol Biochem Parasitol. 118: 11-21.

94. Ware LA, Kain KC, Sim BKL, Haynes JD, Baird JK and Lanar DE. 1993

Two alleles of the 175-Kilodalton Plasmodium falciparum erythrocyte binding antigen

Mol Biochem Parasitol 60 :105-110.

95. Watanabe J, Sasaki M, Suzuki Y & Sugano S. 2001

FULL-malaria: a database for a full-length enriched cDNA library from human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*.

Nucleic Acids Res. 29: 70-71.

96. Wilson RJ, Denny PW, Presier PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, Whyte A,

Strath M, Moore DJ, Moore PW & Williamson DH. 1996

Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *J Mol Biol* 261: 155-172.

97. Wolfe MS, and Cordero JF. 1985

Safety of chloroquine in chemosuppression of malaria during pregnancy.

Br Med J (Clin Res Ed) 290: 1466-1467.

98. Yung S, Unnash TR & Lang-Unnash N. 2001

Analysis of apicoplsat targeting and transit peptide processing in Toxoplasma gondii by deletionaland insertional mutagenesis.

Mol Biochem Parasitol 118:11-21.

99. Zaino EC. 1964

Paleontologic Thalassemia.

Ann N Y Acad Sci 119 :402-412.

100. Zuegge J, Ralph S, Schmuker M, McFadden GI & Schneider G. 2001

Deciphering apicoplast targeting signals-feature extraction from nuclear-encoded precursors of Plasmodium falciparum apicoplast proteins.

Gene 280: 19-26.