



Numéro d'ordre.....

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHE ET

DE FORMATION SUR LE PALUDISME

(CNRFP)

UFR/SCIENCES DE LA VIE
ET DE LA TERRE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
ET PHYSIOLOGIE ANIMALE

THESE UNIQUE

Présentée par
Issiaka SOULAMA
Docteur en Pharmacie

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT UNIQUE DE L'UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

Spécialité : Sciences Biologiques Appliquées

Option : Biologie animale /Parasitologie

Sur le thème :

Diversité génétique des formes asexuées de *Plasmodium falciparum* chez des enfants de moins de 5 ans vivant au Burkina Faso : Variations temporelles, géographiques et cliniques des formes alléliques

Soutenue le 29 Juillet 2010 devant la commission d'examen composée de :

Président: Pr Laya SAWADOGO, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou

Membres: Pr Gustave B. KABRE, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou

Pr Mahamadou THERA, Professeur Agrégé, Université de Bamako

Pr Adrien-Marie Gaston BELEM, Maître de Conférences, Université de Bobo-Dioulasso

Dr Sodiomon B. SIRIMA, MD, PhD, CNRFP, Ouagadougou

DEDICACES

A feu mon père (in memorium).

Mon bonheur serait encore plus immense si tu avais été là. Je suis fier de toi, et je n'oublierai jamais ces mots de courage, d'intégrité, d'honnêteté que tu m'as appris. Oui, tu as été un digne père, à mon tour d'être un digne fils. Reposes en PAIX.

A ma femme Thérèse et à mes enfants Fadel Maké et Kenza.

Ce travail est l'expression de notre attachement à conjuguer nos efforts pour mieux réussir et savoir progresser, alors continuons ensemble notre chemin.

A ma mère et à mes frères et sœurs.

Votre chaleur et votre compréhension m'ont toujours aidé. Que les vœux de solidarité familiale qu'a toujours défendue notre père fassent écho en chacun de nous, afin que nous soyons soudés pour toujours. Ce travail est aussi le vôtre.

Aux enfants qui ont été impliqués dans ce travail.

Vous avez consenti le plus grand sacrifice à ce travail, en consacrant quelques millilitres de votre sang pour faire comprendre cette triste affection. Puisse ce travail en retour vous être bénéfique.

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Laya SAWADOGO

*Professeur Titulaire en Physiologie Animale à l'UFR/SVT.
Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant, malgré vos occupations de présider le Jury de notre thèse.
Sincère reconnaissance.*

Monsieur le Professeur Kabré Gustave :

Professeur Titulaire en Parasitologie à l'Unité de Formation et de Recherche/Science de la vie et de la Terre (UFR/SVT), Vice président de l'Université de Ouagadougou chargé des enseignements et des innovations technologiques. Malgré vos multiples occupations, vous avez accepté diriger ce travail en lui imprégnant vos qualités reconnues de chercheur. Merci Professeur pour votre contribution inestimable dans la formation des jeunes. Trouvez à travers ce travail, notre profonde gratitude et toute notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Sodiomon Bienvenu Sirima

*Docteur en Médecine, Docteur en épidémiologie, Expert de l'OMS/TDR sur la prise en charge du paludisme à domicile, Expert de l'OMS sur l'Initiative de la Recherche de Vaccins, Administrateur Délégué Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, Coordonnateur National du Programme de Développement de Vaccins Antipaludiques (PDVAP).
Vous m'avez non seulement inspiré ce travail, mais vous l'avez co-dirigé avec rigueur et talent en lui imprimant vos qualités de chercheur et d'épidémiologiste, cela malgré vos multiples sollicitations de toute part. Puissent vos qualités de chercheur nous imprégner d'avantage. Trouvez ici, l'expression de notre respectueuse considération.*

Monsieur le Professeur Mahamadou A. Thera,

*Professeur Agrégé de Parasitologie et de Mycologie A la Faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de l'Université de Bamako au Mali
Vous nous honorez en acceptant de parcourir des distances et sacrifier de votre précieux temps pour juger ce travail. Permettez nous de vous traduire toute notre gratitude et notre profond respect.*

Monsieur le Professeur Adrien-Marie Gaston BELEM:

Maître de Conférences à l'Université Polytechnique de Bobo Dioulasso.

C'est un grand plaisir pour nous de vous compter parmi les membres de notre Jury. Recevez ici, nos vifs remerciements.

Ce travail a été l'œuvre de plusieurs personnes et institutions dont les contributions ont été inestimables. Je tiens particulièrement à remercier :

*Le réseau « African Malaria Network Trust » (**AMANET**) et le Programme de Développement de Vaccins Antipaludiques (**PDVAP**) sis au CNRFP pour leur soutiens financiers à la réalisation de ce travail ;*

Le Docteur Issa Nebié Ouédraogo : *Biologiste, Responsable de la section Immuno-Parasitologie au Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, Directeur Technique du Programme de Développement de Vaccins Antipaludiques (PDVAP)*

Votre expérience dans le domaine de la recherche et vos connaissances en biologie nous ont été d'un grand intérêt dans la conduite de ce travail. Trouvez à travers ce travail, toute notre reconnaissance et notre profond respect.

Merci pour votre disponibilité à l'endroit des plus jeunes ;

Le Docteur N'falé Sagnon : *Entomologiste, Responsable de la section Biologie moléculaire au Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme. Merci pour vos inestimables contributions à la réalisation de ce travail ;*

Les enseignants de l'UFR/SVT, *particulièrement ceux chargés des enseignements du troisième cycle de biologie et physiologie animale pour tous les efforts consentis durant les mois passés ensemble ;*

Tout le personnel du Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme particulièrement, *Dr Konaté, Dr Sanogo, Dr Tiono, Mr Diarra, Dr Gansané, Dr Ouédraogo, Mr Lankoandé, Mr Nombéré, Dr Bougouma, Dr Sanou, Dr Yaro, Dr Kaboré, Dr Ouédraogo E, Dr Kargougou, Dr Kangoye, Dr Traoré, Mme Convelbo, Dr Badolo, Dr Bassolé, Dr Guelbéogo, Mr Sombié, Mr Ouédraogo, Sermé, Antoine, Alphonse tous les techniciens et infirmiers du CNRFP*

Vous avez tous contribué à la réalisation de ce travail. Puisse ce travail nous convaincre d'avantage que nous sommes sur le bon chemin même s'il est complexe.

*Nous devons continuer les recherches pour contribuer d'une part à notre façon à faire comprendre la complexité de cette affection mortelle et d'autre part à réduire le fardeau du paludisme dans notre Pays si cher à nous tous.
Formons une équipe solide pour relever ce défi ;*

Les promotionnaires du DEA et de Thèse Unique de Doctorat en Biologie et Physiologie Animale. *Nous avons constitué un groupe solidaire, restons toujours unis pour les défis futurs.*

Résumé

Notre travail a porté sur l'étude de la diversité de *Plasmodium falciparum* chez des enfants de moins de 5 ans infectés, vivant au Burkina Faso en utilisant essentiellement la Polymerase Chain Reaction (PCR). Nous avons évalué trois hypothèses : a) l'influence du niveau de transmission à travers l'étude comparative de la diversité des gènes *msp-1* et *msp-2* de *P.falciparum* entre milieu urbain (District urbain de Pissy) et milieu rural (village de Balonghin, district sanitaire de Saponé) ; b) enfin l'influence de la saison de transmission sur la diversité génétique basé sur le dimorphisme allélique du gène *eba-175* dans quatre villages du district sanitaire de Saponé ; c) le rôle de la diversité du gène *msp-2* sur le profil clinique du paludisme dans la province du Boulgou

L'analyse des résultats de la diversité génétique entre milieu urbain et rural a montré que les allèles Mad20 du gène *msp-1* étaient plus dominants en milieu urbain (85,3%) qu'en milieu rural (63,2%) ($p=0,0001$). En outre, les allèles 3D7 du gène *msp2* ont montré une fréquence plus élevée en milieu urbain (81,3% versus 54,7%) tandis que les allèles FC27 étaient plus fréquents en milieu rural (86,3% versus 68,5%). Ce qui représente un facteur important à prendre en compte dans le contrôle du paludisme.

L'analyse de la variation saisonnière du dimorphisme allélique du gène *eba-175* à montré que les allèles F- étaient plus dominants que les allèles C aussi bien en saison de faible (0,66 versus 0,34 ($p<0,0001$)) que de forte transmission (0,67.versus 0,33($p<0,0001$)). En outre, l'absence d'influence de la saison de transmission et la faiblesse/modération de la différenciation génétique représentent des atouts importants pour l'évaluation de candidats vaccins antipaludiques.

Enfin, les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré qu'il n'y a pas de différence entre les différentes formes cliniques dans la fréquence des allèles FC27 et 3D7 du gène *msp-2* de *P. falciparum*. Cependant, la complexité des souches FC27 était statistiquement plus élevée chez les enfants présentant un paludisme grave d'une manière générale que chez les cas non graves ($P < 10^{-4}$)

Ces résultats constituent des informations utiles pour la caractérisation de sites dans le cadre de développement d'éventuels sites d'essais de vaccins antipaludiques.

Mots clés : *Plasmodium falciparum/malaria/msp-1/msp-2/eba-175/génétique/Diversité/Burkina Faso*

QUELQUES DEFINITIONS

Anticorps : protéines de type gamma-globuline produites par l'organisme au contact d'un antigène

Antigène : substance capable de provoquer la formation d'un anticorps spécifique par l'organisme dans lequel elle s'est introduite.

Allèles : versions alternatives d'un même gène

Chromosome : structures filamenteuses auxquelles est associé le matériel génétique des cellules et des virus

Clone : population de cellules issues d'une même cellule mère ou ancêtre

Complexité de l'infection : Elle correspond au nombre moyen de clones ou souches de *P. falciparum* chez un individu.

Délétions géniques : perte d'un segment de gène ou d'une base sur un chromosome

Duplication génique : synthèse d'un gène identique à la première

Electrophorèse : technique de séparation des molécules (ADN, ARN, protéines) en fonction de leur taille et de leur charge en utilisant un courant électrique.

Gène : segment de chromosome qui code pour un produit fonctionnant (ARN, un polypeptide)

Génome : ensemble des gènes situés sur les chromosomes

Génotype : constitution génétique d'un organisme (par opposition à son aspect physique ou phénotype)

Insertions géniques : addition d'un segment de gène ou d'une base sur un chromosome

Infections multiples ou Polyclonalité de l'infection

Elle correspond à la proportion d'enfants ayant plus d'un fragment ou clone ou souche.

Nucléotide : élément constitutif d'un acide nucléique comprenant une base azotée, un pentose et un phosphate

Polymerase chain reaction (PCR) :

Technique enzymatique permettant l'amplification spécifique (in vitro) d'une séquence nucléotidique précise que l'on désire rechercher ou étudier

Polymorphisme allélique ou diversité génétique : présence simultanée de plusieurs allèles d'un gène homologue

Télomères : extrémités d'un chromosome intervenant dans sa stabilité et dans les processus cellulaires de vieillissements.

Translocation génique : transfert d'un segment de chromosome à un autre non analogue

LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

ADN : Acide désoxyribonucléique

CNRFP : Centre national de recherche et de formation sur le paludisme

CSP : Circum sporozoite protein

dATP : déoxyadénosine-triphosphate

dCTP : déoxycytidine-triphosphate

dGTP: déoxyguanosine-triphosphate

Dhfr : dihydrofolate reductase

Dhps : dihydropteroate synthetase

dNTP: déoxynucléosides-triphosphates

dTTP : déoxythymidine-triphosphate

mM : millimoles/litre

MSP 1, 2 : Merozoite surface protein 1, 2

EBA-175 : Erythrocyte-Binding Antigen-175

OAP : Œdème aigu du poumon

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBS: phosphate buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

PNUD : Programme des nations unies pour le développement

µM/L : micro moles/litre

UNICEF : Fond des Nations Unies pour l'Enfance

WHO: World Health Organisation

LISTE FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Faciès de Transmission du paludisme au Burkina Faso.....	15
Figure 2 : Incidence du paludisme (pour mille) par district sanitaire, 2005.....	16
Figure 3 : Cycle de développement de <i>P. falciparum</i> (Institut Pasteur, D'après (Bischoff 2001).....	23
Figure 4 : Structure du <i>Plasmodium falciparum</i> (Bannister 1995).....	29
Figure 5 : Représentation schématique du gène <i>msp-1</i> de <i>P. falciparum</i> montrant les 17 domaines (Miller 1993).....	35
Figure 6 : Diagramme schématique du gène <i>msp-2</i> illustrant les blocs 1 à 5.....	36
Figure 7 : Structure du gène Erythrocyte Binding Antigen de <i>P.falciparum</i> présentant la région divergente III composée des segments FCR3 et CAMP.....	37
Figure 8 : Carte présentant les districts urbains de Ouagadougou.....	40
Figure 9 : Carte présentant les villages d'étude du district sanitaire de Saponé.....	41
Figure 10 : Site d'étude (District Sanitaire de Tenkodogo) centré sur le CHR de Tenkodogo et les villages de Zano et Gourganbaga.....	42
Figure 11a : Schéma de typage des familles d'allèles <i>msp-1</i>	54
Figure 11b : Schéma de typage des familles d'allèles <i>msp-2</i>	54
Figure 11c : Schéma de typage des familles d'allèles <i>eba-175</i>	54
Figure 12 : Nombre moyen (complexité) des génotypes de <i>Plasmodium falciparum</i> génotypes chez les enfants vivant à Balonghin (milieu rural) et à Pissy (milieu urbain).....	61
Figure 13 : Fréquence des allèles FC27 and 3D7 de <i>P.falciparum</i> en fonction de la taille (pairs de base) et du milieu.....	64
Figure 14 : Fréquence des allèles K1, RO33 et Mad 20 de <i>P. falciparum</i> en fonction de la taille (pairs de base) et du milieu.....	64
Figure 15 : Distribution temporelle des allèles du gène <i>eba-175</i>	69
Figure 16 : Répartition des effectifs en fonction des entités cliniques.....	72
Figure 17 : proportion des patients selon l'âge et les entités cliniques.....	73
Figure 18 : Proportion du nombre de souches par personne.....	79

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Quelques espèces de Plasmodium et leurs hôtes.....	20
Tableau II : Composition du mélange pour amplification (mix).....	51
Tableau III : Températures de dénaturation, d'hybridation, d'élongation et nombre de cycles selon les différentes amorces (primers).....	53
Tableau IV : Fréquence d'enfants porteurs des allèles des gènes <i>msh-1</i> et <i>msh-2</i> selon le milieu.....	62
Tableau V : Fréquence de portage des génotypes <i>eba-175</i> dans la population et la moyenne géométrique de la densité parasitaire (<i>P. falciparum</i> trophozoites/ μ l).....	66
Tableau VI : Fréquence des allèles et index de diversité moléculaire dans les villages de l'étude durant les saisons de faible et forte transmission.....	68
Tableau VII : Estimation de la Différenciation génétique en fonction de la saison et du village par la valeur FST.....	70
Tableau VIII : Estimation des Variances.....	71
Tableau IX : Fréquence des souches 3D7 et FC27 de <i>P. falciparum</i> en fonction des entités cliniques.....	75
Tableau X : Fréquence des formes alléliques FC27 et 3D7 en fonction de l'âge.....	77
Tableau XI : Complexité des souches de type FC27 et 3D7.....	77

SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	1
<i>OBJECTIFS</i>	5
<i>CHAPITRE I: GENERALITES</i>	7
I. LE BURKINA FASO.....	8
I.1. Situation géographique du Burkina Faso	8
I.2. Données environnementales et climatiques du Burkina Faso	8
I.3. Données Socio-démographiques	9
II. RAPPELS HISTORIQUES SUR LE PALUDISME.....	10
III. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME.....	14
III.1. Le paludisme dans le monde et en Afrique	14
III.2. Le Paludisme au Burkina Faso	14
III.2.1. Transmission et ampleur du paludisme	14
III.2.2. Historique de la lutte contre le paludisme	16
III. 3. Agent causal : les plasmodies	19
III.3.1. Taxinomie et biodiversité des plasmodies.....	19
III.3.2. Quelques espèces de <i>Plasmodium</i> et leurs hôtes	19
III.3.3. Les principales espèces plasmodiales à l'origine du paludisme chez l'homme	21
III.4. Le vecteur du paludisme	22
III.5. Le Cycle évolutif du <i>P. falciparum</i>	23
III.5.1. La phase asexuée	24
III.5.2. La phase sexuée	25
III.6. Symptomatologie et évolution du paludisme à <i>P. falciparum</i>	26
III.6.1 Le paludisme asymptomatique.....	26

III.6.2 Accès palustre simple à <i>P. falciparum</i>	26
III.6.3. L'accès palustre grave	27
III.6.4. Autres symptomatologies	28
IV. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DU <i>PLASMIDIUM</i>	28
IV.1. La membrane plasmique.....	29
IV.2. Le cytoplasme.....	29
IV.3. Le noyau.....	30
V. DESCRIPTION CELLULAIRE DES STADES SANGUINS DE <i>P. FALCIPARUM</i> . 30	
VI. STRUCTURE MOLECULAIRE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE <i>P. FALCIPARUM</i>	32
VI.1. La structure des gènes	32
VI.2. Le gène merozoite surface protein-1 (<i>msp-1</i>).....	35
VI.3. Le gène merozoite surface protein-2 (<i>msp-2</i>).....	35
VI.4. Le gène erythrocyte binding antigène-175 (<i>eba-175</i>) de <i>P. falciparum</i> : structure et fonctions.....	37
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES	38
SITE D'ETUDE	39
I.1. Le district sanitaire de Pissy.....	39
I.2. Le district sanitaire de Saponé.....	41
I.3. Le district sanitaire de Tenkodogo	42
I.4. Le Centre National de Recherche et Formation sur le Paludisme (CNRFP)	43
II. TYPE ET PERIODE D'ETUDE.....	44
III. POPULATION D'ETUDE	44
III.1. Estimation de la taille d'échantillon	44
III.2. Critères d'inclusion	45

III.3. Critères de non inclusion	47
IV. COLLECTE DES DONNEES	48
IV.1. Les prélèvements	48
IV.2. Examen microscopique des parasites	48
IV.3. Techniques d'analyse moléculaires : la <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	49
IV.3.1. Extraction de l'Acide désoxyribonucléique (ADN).....	49
IV.3.2. Amplification des extraits d'ADN par la PCR.....	50
IV.3.3. Electrophorèse des extraits amplifiés	55
IV.3.4. Contrôle de qualité et Interprétation des résultats	55
V. CONSIDERATIONS ETHIQUES	56
VI. GESTION ET ANALYSE DES DONNEES	56
CHAPITRE III: RESULTATS	59
I. VARIATION GEOGRAPHIQUE ENTRE MILIEU URBAIN ET RURAL DE LA DIVERSITE DES GENES <i>msp-1</i> ET <i>msp-2</i> de <i>Plasmodium falciparum</i> CHEZ DE ENFANTS DE MOINS DE CINQ ANS	60
I.1. Caractéristiques de l'échantillon	60
I.2. Sensibilité et reproductibilité de la technique d'amplification par PCR	60
I.3. Complexité des infections multiples	61
I.4. Prévalence des allèles des gènes <i>msp-1</i> et <i>msp-2</i>	61
I.5. Distribution des allèles individuels <i>msp-1</i> et <i>msp-2</i>	62
II. VARIATION SAISONNIERE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE <i>P.FALCIPARUM</i> BASE SUR LE DIMORPHISM ALLELIQUE DU GENE ERYTHROCYTE BINDING ANTIGEN (<i>eba</i>)- 175 CHEZ DES ENFANTS DE MOINS DE 5 ANS VIVANT DANS LE DISTRICT SANITAIRE DE SAPONE, BURKINA FASO	65

II.1. Caractéristiques générales de la population d'étude.....	65
II.2. Fréquence de portage des génotypes <i>eba-175</i> et densité parasitaire moyenne ..	66
II.3. Fréquence des allèles/diversité génétique des génotypes <i>eba- 175</i> en fonction des villages de la zone d'étude.....	67
II.4. Fréquence des allèles FCR3 et CAMP en fonction de la saison de transmission.....	68
II. 5. Différenciation génétique des allèles du gène <i>eba-175</i>.....	69
II. 6. Estimation de la variance dans la distribution des allèles du gène <i>eba-175</i>	71
III. DIVERSITE GENETIQUE DE <i>PLAMSODIUM FALCIPARUM</i> ET PROFIL CLINIQUE DU PALUDISME CHEZ DES ENFANTS DE 0 A 5 ANS VIVANT DANS LA PROVINCE DU BOULGOU	72
III.1. Répartition des patients en fonction des entités cliniques	72
III.2. Caractéristiques socio-démographiques.....	73
III.2.1. Proportion des patients selon l'âge et les entités cliniques.....	73
III.2.2. Répartition en fonction du genre	74
III.3. Les paramètres biologiques.....	74
III.3.1. La densité parasitaire	74
III.3.2. Le taux d'hémoglobine	74
III.4. Fréquence des formes alléliques 3D7 et FC27 de <i>P.falciparum</i>.....	75
III.4.1. En fonction des entités cliniques	75
III.4.2. En fonction de l'âge.....	76
III.4.3. L'analyse de la complexité des génotypes FC27 et 3D7 du gène <i>msp2</i>	76
III.4.4. La polyclonalité de l'infection.....	78

CHAPITRE IV: DISCUSSION	80
DE LA VARIATION GEOGRAPHIQUE ENTRE MILIEU URBAIN ET RURAL DE LA DIVERSITE DES GENES MSP-1 ET MSP-2 DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> CHEZ DE ENFANTS DE MOINS DE CINQ ANS	82
DE LA VARIATION SAISONNIERE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> BASEE SUR LE DIMORPHISM ALLELIQUE DU GENE ERYTHROCYTE BINDING ANTIGEN (EBA)- 175 CHEZ DES ENFANTS DE MOINS DE 5 ANS VIVANT DANS LE DISTRICT SANITAIRE DE SAPONE, BURKINA FASO.....	85
DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE <i>PLASMODIUM FALCIPARUM</i> EN FONCTION DU PROFIL CLINIQUE DU PALUDISME CHEZ DES ENFANTS DE 0 A 5 ANS VIVANT DANS LA PROVINCE DU BOULGOU.....	87
CONCLUSIONS	92
PERSPECTIVES	95
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	97
DOCUMENTS CONSULTES	113
ANNEXES	115
Annexe 1 : Liste et séquences des amorces	116
Annexe 2a : exemple de gel d'agarose	117
Annexe 2b : exemple de gel d'agarose	118
Annexe 3 : Article sur la diversité génétique et formes cliniques du paludisme	119
Annexe 4 : Article sur la diversité génétique en fonction du milieu : urbain et rural	124
Annexe 5 : Article sur la variation saisonnière de la diversité génétique	132

INTRODUCTION GENERALE

Le paludisme, causé par des parasites intracellulaires obligatoires du genre *Plasmodium*, est de loin l'une des endémies parasitaires les plus mortelles de notre époque. Aujourd'hui, le genre *Plasmodium* comprend près de 200 espèces constituant un groupe de 9 sous-genres de parasites intracellulaires obligatoires de vertébrés, capables de se développer uniquement chez les mammifères, les oiseaux et les lézards (Rich et Ayala, 2003). Les parasites de l'homme font tous partie soit du genre *Plasmodium* (*Plasmodium*) soit du sous-genre *Plasmodium* (*Laverania*), alors que toutes les autres espèces infectant les mammifères font partie du sous-genre hétérogène *Plasmodium* (*Vinckeia*). *P. falciparum*, l'espèce la plus redoutable des quatre espèces humaines du parasite est principalement à l'origine des cas de décès, notamment chez les enfants de moins de cinq ans.

Les parasites du paludisme sont des organismes haploïdes durant leur cycle de vie chez l'homme. La formation de zygote par croisement de gamètes et les multiplications méiotiques qui s'en suivent se produisent durant la phase de développement chez le moustique vecteur. Durant ces phases de multiplications méiotiques, de nombreux réarrangements génétiques se produisent générant ainsi autant de génotypes parasitaires.

En outre, dans de nombreuses zones endémiques du paludisme notamment en Afrique, bien que les infections soient présentes durant toute l'année, il apparaît une variation saisonnière de l'incidence de la maladie (Baird *et al.*, 2002). Par conséquent, la morbidité et la mortalité de l'infection palustre semblent se concentrer durant et après la saison pluvieuse, correspondant à la période où la transmission du paludisme est élevée, pendant laquelle les populations sont sujettes à un nombre élevé de piqûres, donc aux taux d'inoculations parasitaires les plus élevés. Des études, déjà réalisées sur la conversion des infections asymptomatiques à *P. falciparum* en infections cliniques

associées à la transmission saisonnière du paludisme, ont établi une corrélation avec des modifications dans la composition génétique de la population parasitaire infectant les sujets (Contamin *et al.*, 1995; Roper *et al.*, 1998); Cette variabilité génétique du parasite en fonction du profil clinique, du niveau de transmission ou de l'environnement immédiat représente aujourd'hui un des obstacles majeurs à la recherche de vaccins efficaces contre le paludisme, car ceux-ci peuvent ne pas induire une réponse immunitaire suffisante contre toutes les variantes antigéniques (Takala *et al.*, 2007). D'où l'importance d'une meilleure connaissance de la distribution et de la dynamique des génotypes parasitaires à travers des études sur la diversité génétique dans les régions endémiques du paludisme comme le Burkina Faso où des essais cliniques vaccinaux ou de médicaments sont où doivent être entrepris pour une meilleure conception du produit de l'essai.

La présente étude a été conçue pour évaluer la diversité des génotypes de *P. falciparum* dans une zone endémique du paludisme afin de mieux comprendre d'une part l'influence du niveau de transmission et de l'urbanisation sur la diversité génétique des formes mérozoïtiques de *P. falciparum* et d'autre part l'influence de la diversité génétique sur le profil clinique du paludisme. L'analyse de la diversité des formes mérozoïtiques de *P. falciparum* a été faite sur la base du polymorphisme de trois gènes : *merozoite surface proteins (msp) 1, 2 et erythrocyte binding antigen (eba-175)*, dont les antigènes sont aujourd'hui des candidats vaccins à différents stades d'expérimentation à travers le monde (Rogier *et al.*, 2006).

Le plan de notre rédaction comprend, une introduction, les objectifs de la thèse, une partie généralités sur les aspects du paludisme en rapport avec le sujet une méthodologie qui décrit le cadre de l'étude, les différentes techniques utilisées,

et les chapitres résultats et discussions. Les résultats et discussion seront organisés en fonction de trois thématiques distinctes :

1. La variation géographique de la diversité génétique de *P.falciparum* entre milieu urbain et milieu rural
2. La variation saisonnière de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum*
3. Le rôle de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* sur le profile clinique du paludisme.

Nous terminerons notre rédaction par des conclusions et des perspectives.

OBJECTIFS

1. Evaluer la variation géographique de la diversité génétique de *P.falciparum* entre milieu urbain et milieu rural sur la base des gènes *merozoite surface protein-1* et *merozoite surface protein-2* chez des enfants de moins de cinq vivant en zone endémique du paludisme.
2. Evaluer la variation saisonnière de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* sur la base du dimorphisme allélique du gène *Erythrocyte Binding Antigen (eba)-175* chez des enfants de moins de cinq ans vivant en zone endémique du paludisme.
3. Evaluer le rôle de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* sur le profile clinique du paludisme sur la base du gène *merozoite surface protein-2* chez des enfants de 0 à 5 ans vivant en zone endémique du paludisme.

CHAPITRE I : GENERALITES

I. LE BURKINA FASO

I.1. Situation géographique du Burkina Faso

Le Burkina Faso est un pays sahélien enclavé situé au coeur de l'Afrique de l'Ouest d'une superficie de 274 200 km². Il est limité au Nord et à l'Ouest par le Mali, au Nord-Est par le Niger, au Sud Est par le Bénin et au Sud par le Togo, le Ghana et la Côte d'Ivoire.

I.2. Données environnementales et climatiques du Burkina Faso

Plusieurs facteurs environnementaux et climatiques influençant la prolifération des vecteurs sont associés à l'endémicité du paludisme. Ces facteurs sont la pluviométrie, la température et le couvert végétal. Le Burkina Faso est caractérisé par un climat tropical de type soudanien marqué par l'alternance d'une longue saison sèche (octobre à avril) et d'une courte saison humide (mai à septembre). La durée de la saison des pluies et la pluviométrie totale annuelle permettent de distinguer trois zones climatiques (cf figure 1).

- Une zone soudanienne, plus arrosée avec une pluviométrie comprise entre 1000 et 1300 mm sur une période qui s'étale sur au moins 5 mois. La forte humidité et la pérennité des cours d'eaux, favorisent le développement d'une végétation composée de forêts claires et de forêts galeries en bordure de cours d'eau permanents ;

- Une zone soudano-sahélienne, recevant une pluviométrie comprise entre 600 et 1000 mm sur une période d'environ 4 à 5 mois. La végétation est une juxtaposition de formations arbustives et herbeuses ;

- Une zone sahélienne caractérisée par une pluviométrie annuelle comprise entre 400 et 600 mm sur une période de 3 à 4 mois. La bande sahélienne est caractérisée par une steppe arborée de balanite et acacias radia avec un tapis de graminées sur les dunes et le long des dépressions.

Le réseau hydrographique du Burkina s'organise en trois bassins qui drainent annuellement environ 8 milliards de m³ d'eau. Ce sont : *le bassin de la Volta*, constitué par trois sous-bassins majeurs : ceux du Mouhoun, du Nakambé et de la Pendjari ; *le bassin de la Comoé* et *le bassin du Niger*. Les trois principaux cours d'eau sont : le Mouhoun (anciennement Volta Noire), le Nakambé (Volta Blanche) et le Nazinon (Volta Rouge). Le Mouhoun avec la Comoé, qui coulent au Sud-Ouest sont les seuls fleuves permanent du pays.

D'autre part de nombreuses mares temporaires et permanentes existent sur l'ensemble du territoire mais ne sont pas répertoriées. Il existe également des barrages hydroélectriques aux abords desquels des aménagements agricoles et maraîchers ont été réalisées.

Ces mares et aménagements sont souvent sources de prolifération des vecteurs dont l'anophèle (Guinko, 1984).

I.3. Données Socio-démographiques

Au Recensement Général de la Population et de l'Habitat (RGPH) de Décembre 2006, la population résidente du Burkina Faso était de 14 017 262 habitants parmi lesquels, les femmes représentent 51,7%. Cet effectif correspond à une densité moyenne de près de 38 habitants au kilomètre carré.

Le taux d'accroissement annuel est estimé à 3,1 %.

La majorité de la population du Burkina Faso réside en milieu rural (79,7%) contre 20,3% en milieu urbain.

Les cibles prioritaires pour les questions sanitaires restent aujourd'hui les enfants de moins de cinq (5) ans et les femmes enceintes. Les enfants de moins de 5 ans et les grossesses attendues représentent respectivement 19 % et 5% de la population totale.

II. RAPPELS HISTORIQUES SUR LE PALUDISME

L'histoire de l'humanité nous révèle que le paludisme (du latin *palus, paludis*, marais), aussi appelé malaria (de l'italien *mal'aria*, mauvais air), sévit depuis la haute antiquité (Desowitz, 1991). Cependant, c'est au début du XVIIe siècle que cette fièvre des «marécages» (d'où le nom de paludisme) est identifiée comme une maladie récurrente. Cette pathologie tropicale aurait probablement pour origine l'Afrique et aurait suivi les migrations humaines vers les côtes de la Méditerranée, jusqu'en Inde et en Asie du Sud-Est. Il semble que les colonisateurs européens et les esclaves aient apporté le paludisme dans le Nouveau Monde, où l'anophèle existait déjà.

Dans les années 1630, il a été découvert que les Péruviens traitaient leur fièvre avec de l'écorce de quinquina sous forme de décoction. Cette propriété antipaludique (antipaludique) de l'écorce constatée en Amérique du Sud sera exploitée en Europe et en Inde dès 1657 (Talisuna *et al.*, 2004). Plus tard en 1820, Caventou et Pelletier, deux pharmaciens Français, d'extraire et d'identifier en 1820 le principe actif du quinquina: la quinine, un alcaloïde végétal qui sera utilisé pour la première fois par la France lors de la campagne d'Algérie dans la décennie suivante.

Soixante ans plus tard, très exactement le 6 novembre 1880, Charles-Louis-Alphonse Laveran, médecin de l'armée française (prix Nobel de médecine en 1907) identifiait à Constantine l'agent pathogène du paludisme en examinant des échantillons

de sang au microscope. Il l'appela *Laverania falcipara* qui est devenu plus tard *Plasmodium falciparum*. Mais ce n'est qu'en 1886 que sa découverte fut acceptée par les scientifiques italiens (Nosny, 1980). Peu de temps après les Italiens Marchiafava, Celli et Golgi classèrent ce parasite en trois espèces: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium malariae*.

L'hypothèse de la transmission de la maladie par un moustique émise en 1882 fut validée en 1897. A cette date, le British Medical Journal publiait en effet, les travaux de Ronald Ross montrant des kystes paludéens dans les parois de l'estomac d'anophèles ayant piqué un malade atteint de paludisme (Dobson, 1999). Une année plus tard, en 1898, Giovanni Batista Grassi, scientifique italien, décrivit les transformations du parasite dans le moustique et prouva ainsi que le paludisme observé chez l'homme était transmis par des moustiques du genre *Anopheles* (Fantini, 1999).

La quatrième espèce de parasite du paludisme infectant l'Homme, *Plasmodium. ovale*, fut identifiée en 1922.

La seconde guerre mondiale, et le manque de quinine auront contribué à la mise au point de nouvelles molécules synthétiques antipaludiques. Ainsi la chloroquine, composée de la famille des amino-4quinoléines est mise au point en 1934 par une société pharmaceutique allemande.

L'endémicité et l'ampleur du paludisme dans le monde ont conduit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) au milieu des années 1950 à lancer l'un des programmes historiques de la lutte contre le paludisme, l'éradication du paludisme (par la lutte anti vectorielle) par la pulvérisation de DDT à l'échelle mondiale (Giglioli, 1951).

Malheureusement, les années 1960 seront caractérisées par l'apparition de souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine à cause de son utilisation excessive et, probablement, de doses insuffisantes. La chloroquine étant à ce moment la

seule molécule efficace, en dehors du plus ancien antipaludique, la quinine, les recherches aboutiront à la synthèse d'un dérivé de quinoléine ; il s'agit de la méfloquine dont la structure chimique ressemble à celle de la quinine. En outre, une substance naturelle, le Qinghaosu, dérivé d'une plante (*Artemisia annua L*), employée depuis plus de deux mille ans en Chine pour traiter les fièvres associées au paludisme va donner naissance à un « nouvel » antipaludique : l'artémisinine. L'efficacité de cette molécule contre les formes mortelles de paludisme à *Plasmodium falciparum* et les souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine a été démontrée en 1986 (Pe Than et Tin, 1986).

En 1972, conscient des multiples échecs enregistrés lors de sa mise en œuvre, l'OMS a mis fin au programme mondial d'éradication du paludisme en mettant en place d'autres moyens et stratégies afin de limiter l'ampleur de la maladie.

En 2001, en collaboration avec l'UNICEF, le PNUD et la Banque Mondiale, l'OMS proclame la décennie 2001-2010 comme celle des Nations Unies pour faire reculer le paludisme dans les pays en voie de développement, particulièrement en Afrique (Decade to Roll Back Malaria) (WHO, 2000a).

Parallèlement aux efforts consentis par l'Organisation mondiale de la santé, les institutions de recherche du Nord et du Sud entreprenaient et poursuivaient leurs activités pour la recherche d'un vaccin efficace contre le paludisme. Les premières tentatives de développer un vaccin antipaludique contre des infections à *P. falciparum* datent de 1973 (Clyde *et al.*, 1973). En 1988, de nombreux espoirs de la recherche ont été portés sur le vaccin SPf 66 du Dr Pattayaro, premier à être testé sur le terrain (Millet *et al.*, 1993), qui malgré la faible réduction des cas cliniques constatée en Amérique Latine, n'a pas fait preuve d'une grande efficacité en Afrique. Cependant, ce vaccin aura eu le mérite de préparer le terrain pour des recherches futures. Ainsi, depuis lors, environ une centaine de candidats vaccins provenant d'une vingtaine d'antigènes sont aujourd'hui à différentes

phases d'essai à travers le monde (Graves et Gelband, 2003). Le plus avancé de ces vaccins est le RTS, S/AS02A. C'est un vaccin composé de particules protéiques comprenant 19 copies de la portion répétée centrale de la CSP et d'une partie (épitopes T) de sa région carboxy-terminale fusionnées à l'antigène S du virus de l'hépatite B et d'un adjuvant complexe, l'AS02A (Gordon, 1995). Les résultats déjà obtenus avec ce dernier vaccin ont montré chez les enfants une réduction de 45% du risque de nouvelles infections et une réduction de 57% du risque d'accès palustre grave au cours des six premiers mois (Alonso *et al.*, 2004).

La recherche fondamentale a également connu des avancées majeures pour une meilleure connaissance du parasite, du vecteur et de l'homme se poursuivait. Dans ce sens, la découverte de la technique de polymérisation en Chain ou PCR par Bruce Willis en 1983 va accélérer les études génétiques et moléculaires aussi bien du parasite que du vecteur du paludisme. Les projets de séquençage des génomes de *Plasmodium falciparum* et d'*Anopheles gambiae* (principal moustique vecteur du paludisme) initiés par un Consortium International des Centres de Génome dans les années 1996 (Barry, 2005) ont permis de publier en 2002 la séquence complète des deux génomes (Gardner *et al.*, 2002; Holt et Clark, 2002.). Ces nouvelles données sur le parasite, le vecteur et les méthodes de recherches marquent un tournant décisif et permettront d'explorer des aspects encore inconnus de la biologie du parasite et de son vecteur afin de promouvoir le développement de nouvelles stratégies diagnostiques, thérapeutiques et/ou vaccinales destinées à contrôler le paludisme.

III. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME

III.1. Le paludisme dans le monde et en Afrique

Le paludisme représente un véritable problème de santé publique dans le monde. Le rapport de l'OMS en 2009 (WHO 2009), montrait que la moitié de la population mondiale (environ 3,3 milliards) est exposée au risque de paludisme et on estimait à 243 millions le nombre de cas en 2009 dont 85% dans la région Africaine. On estime à 863 000 le nombre de décès par paludisme en 2009, dont environ 89 % ont eu lieu en Afrique au sud du sahara.

Les estimations de l'incidence du paludisme s'appuient en partie sur le nombre de cas déclarés par les programmes nationaux de lutte antipaludique. Au total, les programmes nationaux de lutte antipaludique ont déclaré 94 millions de cas de paludisme en 2006, ce qui représente 37% de l'incidence estimative à l'échelle mondiale et 301 000 décès par paludisme, soit 34 % de la mortalité estimative à l'échelle mondiale en 2006.

On estime que l'incidence du paludisme doublera dans les vingt prochaines années si aucune méthode de contrôle efficace n'est trouvée.

III.2. Le Paludisme au Burkina Faso

III.2.1. Transmission et ampleur du paludisme

Au Burkina Faso, Il existe 3 faciès de transmission du paludisme (voir figure 1) :

- une transmission permanente dans les régions du Sud et du Sud-Ouest;
- une transmission saisonnière longue au centre d'une durée de 4-6mois ;
- une transmission saisonnière courte au nord du pays d'une durée de 2-3 mois avec des risques potentiels d'épidémies de paludisme.

Cependant, quel que soit le faciès et à l'instar de la plupart des pays de l'Afrique subsaharienne, le paludisme malgré une incidence variable en fonction des régions du pays

demeure toujours la première cause de consultation, d'hospitalisation et de mortalité surtout chez les enfants de moins de cinq ans (figure 2). En effet, en 2006, le paludisme représentait respectivement 40,7% 53,4% 45,8% des consultations, hospitalisations et décès dans les formations sanitaires au Burkina Faso (DEP 2007). Malheureusement, en 2008, ces chiffres se sont accrus et étaient respectivement de 44,54%, 72,5% et 48,3 pour les consultations, hospitalisations et décès dus au paludisme dans les formations sanitaires du pays (DEP 2009). En terme de vulnérabilité, les enfants de moins de 5 ans représentent la population la plus à risque avec plus de 45 % en 2006 et 48,4% en 2008 des cas de consultations pour paludisme et plus de 75% en 2006 et 68 % en 2008 des décès liés au paludisme enregistrés en milieu hospitalier, (DEP 2007; DEP 2009).

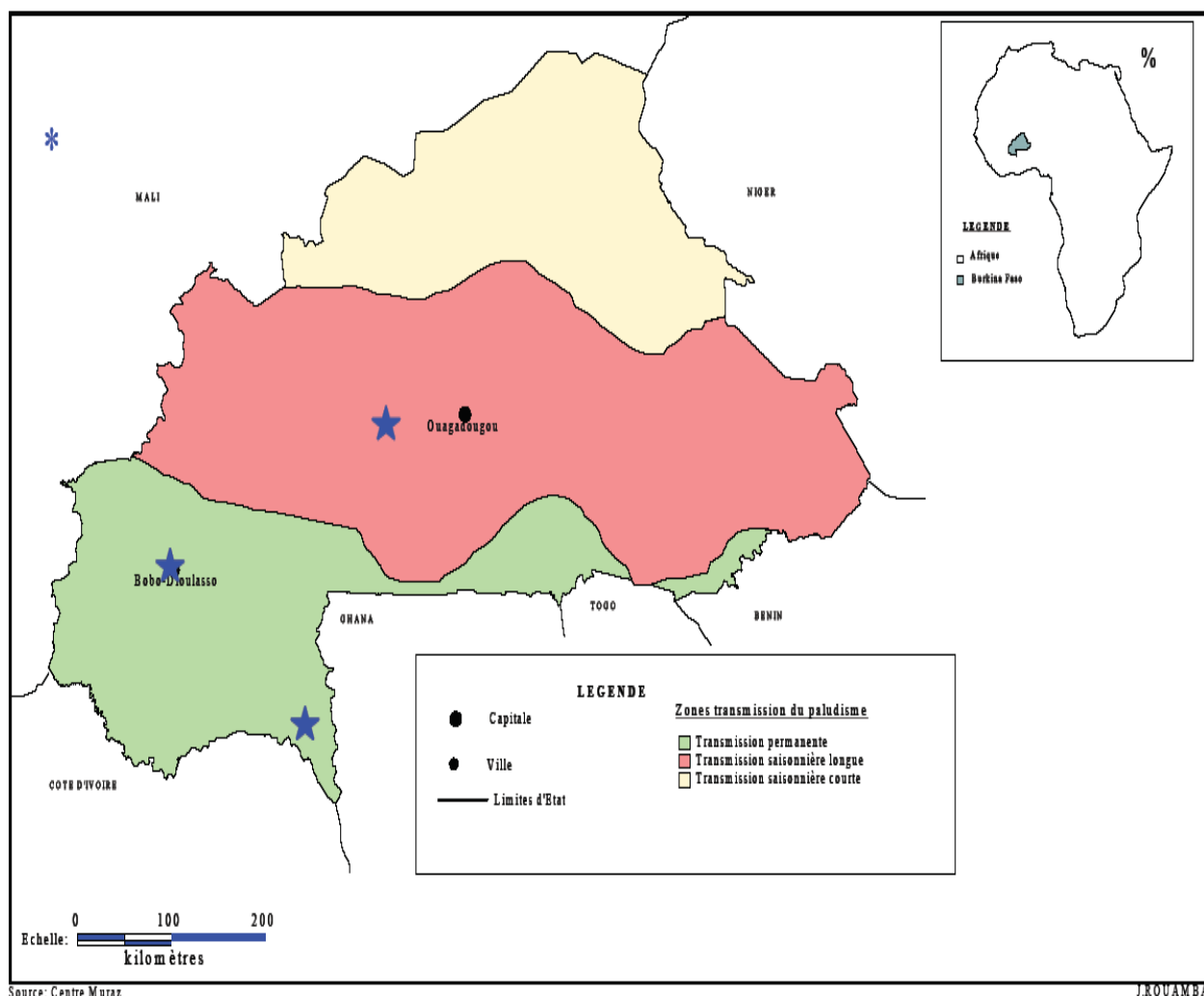


Figure 1 : Faciès de Transmission du paludisme au Burkina Faso

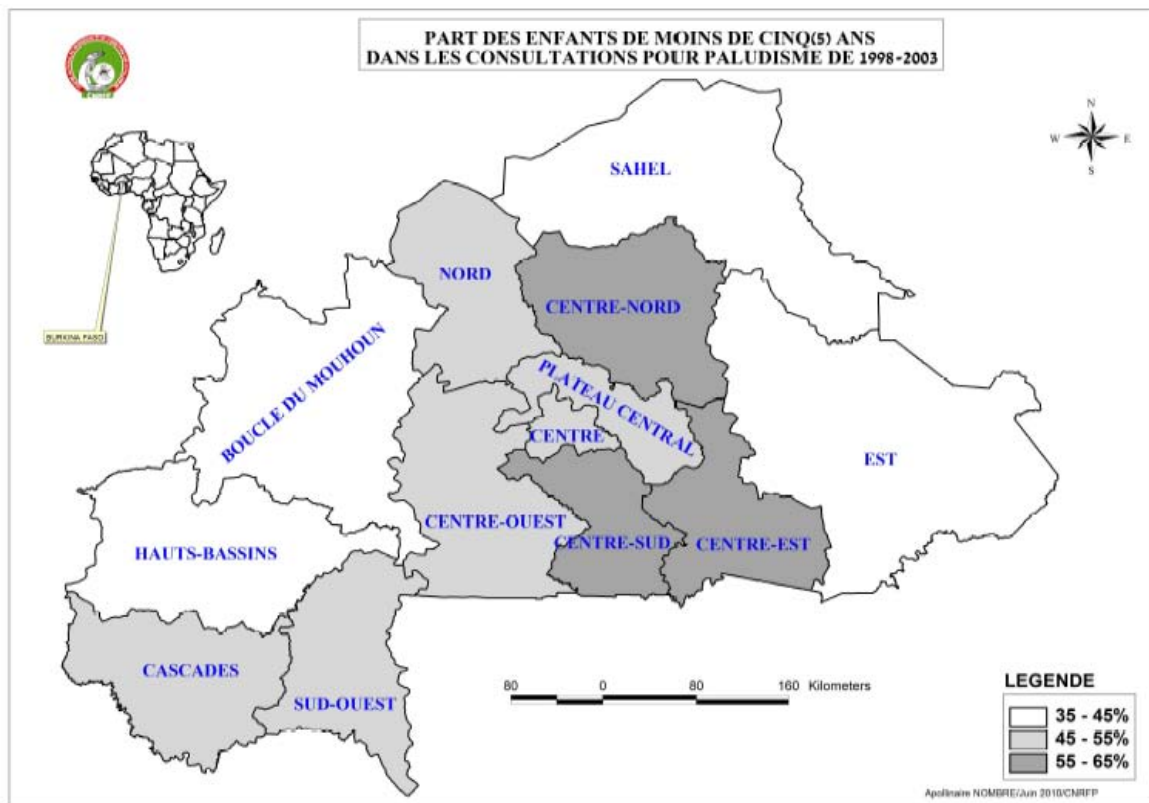


Figure 2: Incidence du paludisme (pour mille) par district sanitaire, 2005

III.2.2. Historique de la lutte contre le paludisme

En dehors des traitements de médecine traditionnelle utilisée par les populations, la lutte contre le paludisme au Burkina Faso a été marquée par des périodes clefs dont les plus importantes sont résumées comme suit :

- ❖ 1941 : début des études épidémiologiques dans la région de Bobo-Dioulasso ;
- ❖ 1947 : création d'une section Paludisme au sein du Service Général d'Hygiène Mobile et de Prophylaxie chargée du programme d'éradication et de la chimioprophylaxie de masse
- ❖ 1972-1974 : introduction de la chimioprophylaxie chez les enfants de moins de 5 ans et chez les femmes enceintes pendant la période de transmission intense ;

- ❖ 1979 : intégration du traitement présomptif à la dose de 10 mg/kg de chloroquine de tout accès fébrile et de la chimioprophylaxie chez la femme enceinte suite aux études du Centre Muraz;
- ❖ 1984 à 1985 : mise en oeuvre d'un programme de lutte anti-vectorielle à Ouagadougou ;
- ❖ 1985 : création du centre de Référence de la Chimio-sensibilité du Paludisme (CRCP) au Centre Muraz ;
- ❖ 1987 : création du Centre National de Lutte contre le Paludisme (CNLP) assurant la coordination des activités de contrôle de l'endémie au Burkina Faso
- ❖ 1988 : détection de foyers de chimiorésistance et révision de la posologie du traitement par la chloroquine à 25 mg/Kg de poids ;
- ❖ 1991 : adoption d'un schéma thérapeutique standard pour le traitement du paludisme et création du Programme national de Lutte contre le paludisme;
- ❖ 1993-1995 : expérimentation et présentation des résultats encourageants sur l'imprégnation des rideaux et des moustiquaires;
- ❖ 1995 : restructuration du Programme National de Lutte contre le Paludisme dans le cadre de la politique nationale de lutte contre le paludisme ;
- ❖ 1996 : adoption de la Prise en Charge Intégrée des Maladies de l'Enfant (PCIME)
- ❖ 1997-1998: lancement de l'Initiative Africaine de lutte contre le paludisme au XXIe siècle par l'OUA et mise en oeuvre du Programme d'Accélération de la Lutte Antipaludique (PALAP) ;
- ❖ 1998 : lancement de l'initiative mondiale «Faire Reculer le Paludisme» ;
- ❖ 1999 : restructuration du CNLP en Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme ;

- ❖ 2002 : lancement officiel de l'initiative FRP au Burkina Faso à partir de la ville de Koupéla ;
- ❖ 2003 : confirmation du phénomène de chimiorésistance à la chloroquine (26,9% à 63,3%) et à la sulfadoxine-pyriméthamine (10%) ;
- ❖ Février 2005 : révision et adoption d'une nouvelle politique thérapeutique avec introduction des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) et du Traitement Présomptif Intermittent (TPI) à la sulfadoxine-pyriméthamine chez la femme enceinte.

Parallèlement à ces différentes actions de lutte contre le paludisme, il faut souligner l'importance des différentes études entreprises par les centres de recherche sur le paludisme dans la recherche d'un vaccin antipaludique, il s'agit notamment :

- En 2003, le CNRFP avec l'évaluation de la tolérance et l'innocuité du vaccin contre le paludisme MSP3 sous forme Long peptide synthétique chez des volontaires adultes de sexe masculin, au Burkina Faso : un essai de phase I, ouvert, contrôlé et randomisé.
- En 2007 le CNRFP avec l'essai clinique de phase Ib, contrôlé, randomisé, en double aveugle, avec progression de doses chez les enfants de 12 à 24 mois au Burkina Faso, pour évaluer la tolérance et l'immunogénicité de l'antigène de surface de *Plasmodium falciparum*, la Merozoite Surface Protein-3 Long synthetic peptide (MSP3) adjuvée à l'hydroxyde d'aluminium versus le vaccin de l'hépatite B.
- En 2009, l'IRSS de Bobo Dioulasso avec l'essai de phase III du vaccin RTS'S actuellement en cours chez environ 1000 enfants Burkinabè.

III. 3. Agent causal : les plasmodies

III.3.1. Taxinomie et biodiversité des plasmodies.

La classification classique de Graham des plasmodies est basée sur les critères morphologiques et des particularités du cycle biologique. Aujourd'hui, *P. falciparum* prend place dans le règne des protistes (sous *Alveolata* sous *Eukaryota*) et appartient au Phylum des organismes parasites obligatoires, les *Apicomplexa* (anciennement *Sporozoa*, "capables de germer d'autres cellules") (Vivier et Desportes 1989) et à l'ordre des *Haemosporida*. En terme morphologique, les *Apicomplexa* sont caractérisés par la présence d'un complexe apical, leur permettant de pénétrer à l'intérieur de la cellule hôte. Les hémospories sont toutes caractérisées comme l'indique leur nom par leur présence dans le sang de vertébrés. Elles ont toutes deux hôtes : un hôte vertébré chez lequel se passe la reproduction asexuée (l'hôte intermédiaire), et un insecte piqueur chez lequel se passe la reproduction sexuée (l'hôte définitif).

Différentes espèces composant aujourd'hui le genre *Plasmodium* sont réparties en 9 sous-genres de parasites intracellulaires obligatoires de vertébrés, capables de se développer uniquement chez les mammifères, les oiseaux et les lézards (Rich et Ayala 2003). Les parasites infectant l'homme et les primates font tous partie soit du genre *Plasmodium* (*Plasmodium*) soit du sous-genre *P. (Laverania)*, alors que toutes les autres espèces infectant les mammifères font partie du sous-genre hétérogène *Plasmodium* (*Vinckeia*).

III.3.2. Quelques espèces de *Plasmodium* et leurs hôtes

Cent vingt trois espèces du genre *Plasmodium* ont été répertoriées et elles possèdent des cycles biologiques proches mais présentant quelques différences.

Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires des vertébrés transmis par les moustiques femelles. Un grand nombre de vertébrés sont susceptibles d'être infectés par un *Plasmodium*, mais la spécificité de l'hôte est étroite, chaque espèce plasmodiale n'infecte qu'un petit nombre d'hôtes (Tableau I). Il existe différents niveaux d'interactions hôte-parasite avec des compatibilités et des incompatibilités partielles ou totales.

Tableau I : Quelques espèces de Plasmodium et leurs hôtes

Espèces	Hôtes vertébrés naturels ou occasionnels
<i>P. falciparum</i>	Homme
<i>P. vivax</i>	Homme
<i>P. ovale</i>	Homme
<i>P. malariae</i>	Homme, singes
<i>P. knowlesi</i>	Singes asiatiques, Homme
<i>P. coatneyi</i>	Singes asiatiques, Homme
<i>P. cynomolgi</i>	Singes asiatiques, Homme
<i>P. booliati</i>	Singes asiatiques
<i>P. watteni</i>	Singes asiatiques
<i>P. simium</i>	Singes du Nouveau Monde, Homme
<i>P. brasilianum</i>	Singes du Nouveau Monde, Homme
<i>P. anomaluri</i>	Singes africains
<i>P. landauae</i>	Singes africains
<i>P. pulmophilum</i>	Singes africains
<i>P. gallinaceum</i>	Poulet
<i>P. juxtannucleare</i>	Poulet
<i>P. relictum</i>	Pigeon
<i>P. elongatum</i>	Oiseaux
<i>P. cathemerium</i>	Hirondelle, canari
<i>P. atheruri</i>	Porc-épic
<i>P. berghei</i>	Rongeurs murins
<i>P. yoelii (yoelii, killicki, nigeriensis)</i>	Rongeurs murins
<i>P. vinckei (vinckei, petteri, lentum...)</i>	Rongeurs murins
<i>P. chabaudi (chabaudi, adami)</i>	Rongeurs murins
<i>P. aegyptensis</i>	Rongeurs murins
<i>P. agamae</i>	Lézards
<i>P. wenyoni</i>	Serpents

Cependant, il est possible d'adapter des espèces plasmodiales de façon à infecter des vertébrés qui ne sont pas leurs hôtes naturels. C'est le cas des espèces de *Plasmodium*

des rongeurs utilisées au laboratoire, dont les hôtes naturels sont des rongeurs africains, mais qui ont été adaptés à la souris ou au rat. C'est aussi le cas de *P. falciparum* et *P. vivax* qui infectent des singes du Nouveau Monde.

Mais aussi il a été récemment souligné la possibilité pour le *Plasmodium knowlesi* (Peter *et al.* 2009) d'infecter l'homme au même titre que les autres *P. falciparum, malariae, ovale et vivax*.

III.3.3. Les principales espèces plasmodiales à l'origine du paludisme chez l'homme

Les principales espèces de *Plasmodium* à l'origine du paludisme chez l'homme sont représentées par : *Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae, Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*.

III.3.3.1. *Plasmodium falciparum*

Il est responsable d'une fièvre tierce maligne et présente des particularités biologiques :

- Au niveau du foie : *Plasmodium falciparum* évolue successivement des stades trophozoïte, mérozoïte, schizonte jeune jusqu'au schizonte exo-érythrocytaire mature. Cette évolution se fait sans interruption, et *P. falciparum* ne présente pas de réviviscence schizogonique (reprise de la multiplication des schizontes après une phase d'interruption).

- Au niveau du sang, la schizogonie du *Plasmodium falciparum* se déroule dans les capillaires viscéraux où les hématies parasitées sont séquestrées du fait de leur adhérence à l'endothélium. Chaque schizogonie dure 48 heures et détermine une fièvre tierce maligne.

III.3.3.2. *Plasmodium malariae*

A la phase hépatique, la multiplication asexuée par schizogonie de *P. malariae* est plus lente que celle du *Plasmodium falciparum*. La phase sanguine est caractérisée par l'existence de formes latentes du parasite, responsables de rechutes à long terme. C'est l'agent responsable de la fièvre quarte bénigne ou fièvre quartane (accès fébriles survenant tous les quatre jours). L'espèce *P. malariae* peut déterminer à la longue des lésions rénales graves pouvant évoluer vers l'insuffisance rénale.

III.3.3.3. *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax*

Ces deux espèces diffèrent du *Plasmodium falciparum* en ce sens que :

- au cours de la phase hépatique, une partie des trophozoïtes évoluent directement jusqu'au schizonte mature. Les autres ont une schizogonie tissulaire retardée et à déclenchement périodique, ce qui explique l'existence des rechutes à long terme, responsables des accès de réviviscence schizogonique.

- la schizogonie sanguine s'effectue dans des vaisseaux de gros calibres, et détermine de façon générale des accès sans gravité. Ces deux espèces sont responsables de la fièvre tierce bénigne (accès fébriles apparaissant tous les trois jours et durent environ une dizaine d'heures).

Des quatre espèces plasmodiales, *Plasmodium falciparum* représente l'espèce la plus redoutable à l'origine des formes graves du paludisme notamment chez les enfants de moins de 5 ans.

III.4. Le vecteur du paludisme

Le vecteur du paludisme est l'anophèle femelle. C'est un moustique hématophage de la famille des Culicidae et de la sous famille des Anophelinae. Plusieurs espèces

d'anophèles vecteurs du paludisme chez l'homme ont été identifiées dont les principales sont: *Anopheles gambiae s.l.*, *Anopheles funestus s.l.*, (Costantini, 1999) *Anopheles moucheti*, et *Anopheles sinensis* (Gentilini, 1993).

Au Burkina Faso, les trois premiers ci-dessus cités sont considérés comme les principaux vecteurs du paludisme (Majori *et al.*, 1987; Petrarca *et al.*, 1996).

III.5. Le Cycle évolutif du *P. falciparum*

Le cycle des plasmodiens comporte deux phases : une phase sexuée qui se déroule chez l'insecte vecteur, l'anophèle femelle et une phase asexuée observée chez l'hôte intermédiaire vertébré (Figure 3).

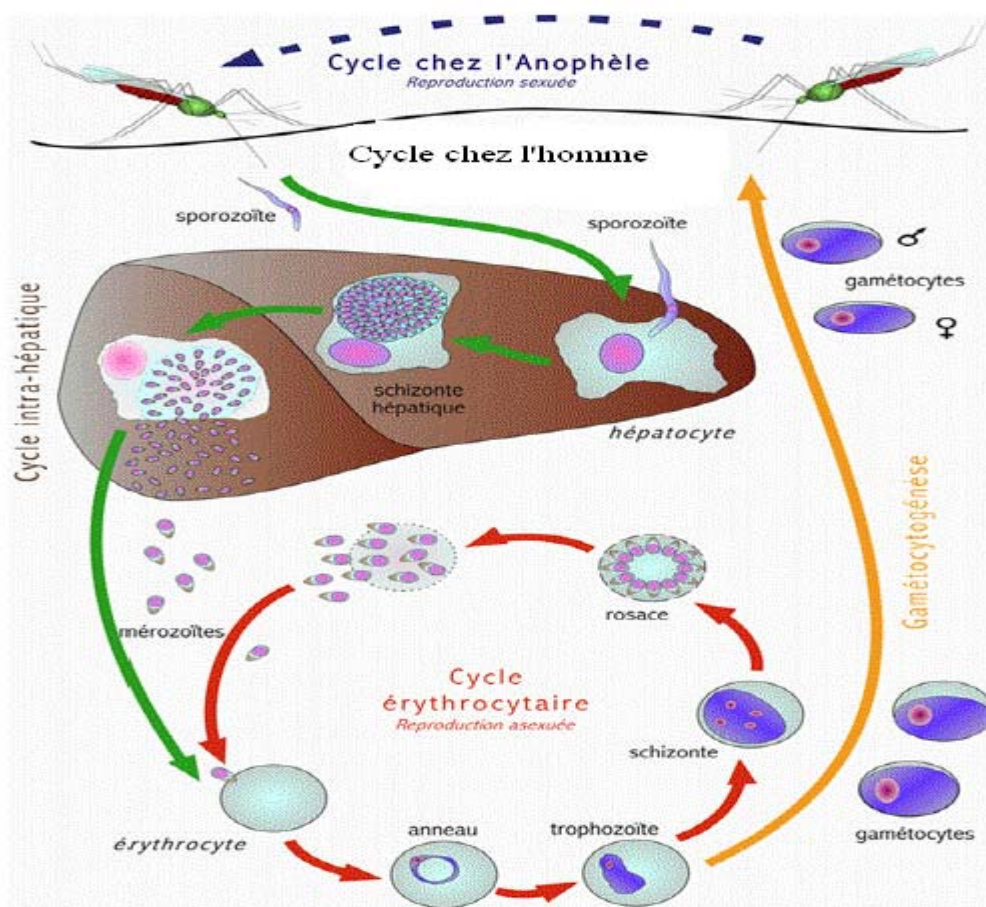


Figure 3 : Cycle de développement de *P. falciparum* (Institut Pasteur, D'après (Bischoff 2001))

III.5.1. La phase asexuée

Elle est caractérisée par la multiplication asexuée du parasite par schizogonie. On distingue deux types de schizogonie:

- la schizogonie exo-érythrocytaire : elle se déroule durant le cycle intra-hépatique (Sinou 1998). Ainsi, lors d'une piqûre infectante, l'anophèle femelle va injecter dans la circulation sanguine, les sporozoïtes représentant les formes infectantes du parasite. En quelques dizaines de minutes, ces sporozoïtes pénètrent dans les hépatocytes où ils se transforment en cellules végétatives appelées trophozoïtes. A la faveur de mitoses successives et à la différenciation de nouveaux germes unicellulaires infectants ou merozoïtes éxoérythrocytaires, le trophozoïte exoérythrocytaire se transforme en une à trois semaines plus tard à un schizonte hépatique mature (ou corps bleu). L'éclatement du corps bleu, libère plusieurs milliers de merozoïtes (10.000 chez *P. vivax*, 40.000 à 50.000 chez *P. falciparum*, plus de 15.000 chez *P. ovale* et 7.500 chez *P. malariae*) qui migreront via la voie sanguine vers les hématies.

Chez certaines espèces, telles *P. vivax* et *P. ovale* chez l'homme ou *P. cynomolgy* chez le singe, les sporozoïtes peuvent rester en état de dormance dans les hépatocytes sous la forme d'hypnozoïtes et ne se développent qu'ultérieurement (périodes de reviviscence) (Mazier 1991). La schizogonie éxoérythrocytaire qui dure 6 à 9 jours pour *P. falciparum* et 15 jours pour *P. malariae* est souvent asymptomatique.

Les rechutes tardives de paludisme observées lors d'infections par *P. vivax* et *P. ovale* sont dues à la possibilité pour les stades cryptozoïtes de subsister sous une forme latente ("hypnozoïte") dans la cellule hépatique de l'homme. Les rechutes tardives des personnes infectées par *P. malariae* résultent, quant à elles, de la persistance de formes "quiescentes" dans le réseau lymphatique humain. *P. falciparum* ne présente ni hypnozoïtes ni schizogonie tissulaire secondaire

- la schizogonie endoérythrocytaire ou érythrocytaire: les merozoïtes éxoérythrocytaires libérés des hépatocytes pénètrent dans les érythrocytes par un mécanisme complexe où ils évoluent en stade de jeunes trophozoïtes ("anneaux" ou "ring"), de trophozoïtes matures puis en schizontes (forme de multiplication et de maturation). La rupture de la membrane du globule rouge par le schizonte mature (ou corps en rosace) libère les merozoïtes qui vont envahir des hématies saines et initier un nouveau cycle de développement intracellulaire ou se différencier en gamétocytes mâles et femelles.

Le cycle endoérythrocytaire dure 48 heures pour *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum* et 72 heures chez *P. malariae*. Les signes pathologiques du paludisme sont généralement détectés au cours de la schizogonie endoérythrocytaire. En effet, l'éclatement des globules rouges contenant les formes schizontes matures libère outre les merozoïtes, de l'hémozoïne (pigment malarique provenant de la dégradation de l'hémoglobine) et des substances toxiques inductrices des accès fébriles caractéristiques de la maladie (Sinou 1998).

III.5.2. La phase sexuée

Les gamétocytes absorbés lors du repas sanguin d'un anophèle femelle subissent la gamétocytogénèse dans l'estomac du moustique.

Le microgamonte mâle se différencie en l'espace d'une dizaine de minutes en 8 microgamètes haploïdes et flagellés; c'est le phénomène d'exflagellation.

Le macrogamonte femelle évolue en un macrogamète sans division nucléaire. La fécondation donne naissance à un zygote mobile (ookinète) qui traverse l'épithélium intestinal et s'enkyste entre la lamelle basale et les cellules épithéliales pour évoluer en oocyste. L'oocyste subit une division réductionnelle suivie de mitoses multiples donnant naissance à des milliers de sporozoïtes. Après éclatement de l'oocyste, et par un tropisme

mal connu, les sporozoïtes migrent dans les glandes salivaires où ils s'accumulent (Sinou 1998).

Chacune des étapes du développement de *Plasmodium* comprend une séquence complexe d'événements moléculaires. Tout au long de son cycle cellulaire, le parasite présente des formes et des tailles différentes, qui reflètent des fonctions très différentes.

III.6. Symptomatologie et évolution du paludisme à *P. falciparum*

III.6.1 Le paludisme asymptomatique

Le paludisme asymptomatique ou paludisme d'infestation se définit comme étant l'absence de manifestations cliniques chez un individu présentant des formes asexuées du parasite à l'examen du sang périphérique. Un tel sujet est un porteur sain et constitue un important réservoir du parasite en zone d'endémie. Ce portage asymptomatique peut évoluer à tout moment vers un paludisme clinique simple ou grave.

III.6.2 Accès palustre simple à *P. falciparum*

Ce sont des accès palustres classiques sans aucun signe de malignité avec une période d'incubation de 7 à 15 jours (Gentilini 1993).

La phase d'invasion au cours de l'accès palustre simple est caractérisée par une fièvre continue (39°-40°) accompagnée de céphalées, nausées ou vomissements. A la phase d'état, les accès prennent une évolution de type tierce (schizogonies toutes les 48 h). Ces accès sont typiques: fièvre de 39°- 40°, frissons, sueurs accompagnées de céphalées, de vomissements et d'une splénomégalie parfois d'une hépatomégalie. Non traité, l'accès peut tout de même guérir après une quinzaine de jours de fièvre, d'abord

continu puis plus ou moins intermittent. Mais à tout moment, le risque d'évolution maligne vers la forme grave est possible.

Globalement, ces accès simples à *P. falciparum* représentent 90 % des cas de paludisme dus à cette espèce (Gentilini, 1993).

III.6.3. L'accès palustre grave

Selon l'OMS, le paludisme grave se définit par la présence de formes asexuées de *P. falciparum* à l'examen microscopique du sang périphérique, associée à une ou plusieurs des manifestations suivantes (WHO, 2000).

- Altération de l'état de conscience : coma (score de Blantyre < 3) persistant pendant au moins 30 minutes, ne pouvant être rapporté à une autre cause ;
- Convulsions généralisées et répétées (plus de 2 par 24 heures, plus de 15 minutes de phase post critique) ;
- Anémie sévère (normocytaire, hématocrite < 15 % ou taux hémoglobine < 5 g/dl) ;
- Insuffisance rénale (diurèse < 12 ml/kg/24 heures ou créatinine > 265 µmol/l) ;
- Œdème aigu du poumon (ou syndrome de détresse respiratoire aiguë) ;
- Hypoglycémie (glycémie < 2,2 mmol/l ou 0,4 g/l) ;
- Collapsus circulatoire ;
- Hémorragie diffuse (ou coagulation intravasculaire diffuse, CIVD) ;
- Hémoglobinurie massive ;
- Acidose sanguine (pH artériel < 7,25 ou bicarbonates < 15 mmol /l) ;
- Prostration ou faiblesse extrême ;
- Ictère (clinique ou bilirubine > 50µmol/l ou >30 mg/l).

L'accès palustre grave dû à *P. falciparum* représente la complication la plus redoutable car le taux de létalité lié au paludisme grave est très élevé.

Les complications les plus courantes et les plus graves de l'atteinte par *P. falciparum* sont le paludisme cérébral et l'anémie sévère (OMS, 1990).

Au Burkina Faso, la prévalence du paludisme cérébral est plus élevée en milieu urbain tandis que l'anémie sévère sévit plus fortement en milieu rural (Modiano *et al.*, 1999).

Les formes anémiques plus fréquentes en milieu rural constituent en Afrique une importante cause de mortalité chez les jeunes enfants (Newton *et al.*, 1997; Biemba *et al.*, 2000).

Dans le cas des accès palustres graves, un traitement d'urgence doit être instauré afin de circonscrire au plus tôt d'éventuelles complications notamment neurologiques.

III.6.4. Autres symptomatologies

- Les formes avec hypoglycémie

Elles se définissent comme une complication grave et souvent fatale du paludisme chez l'enfant ayant une glycémie < 2,2 mmol/l ou 0,4 g/l avec une parasitemie très élevée. Elles entraînent un coma profond. L'hypoglycémie est souvent méconnue, d'autant plus que ses manifestations sont semblables à celles du paludisme cérébral (OMS 1990).

- Autres formes graves de paludisme

Ce sont des formes avec insuffisance rénale aiguë, hémoglobinuries, œdème aigu du poumon (OAP), collapsus ou choc, hémorragies (OMS 1990). Elles sont rares chez l'enfant

IV. DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DU *PLASMODIUM*

Le *Plasmodium* est un protozoaire très petit de 1 à 2 μ selon les formes; la coloration au May-Grünwald-Giemsa montre qu'il est constitué d'un *cytoplasme* annulaire bleu pâle

entouré d'une *membrane plasmique* et contenant un *noyau* rouge et du pigment brun-doré ou noir (hémozoïne).

IV.1. La membrane plasmique

Les protéines ancrées dans cette membrane varient en fonction des stades évolutifs du parasite. Ces protéines développent des fonctions antigéniques ou non à la surface de la membrane.

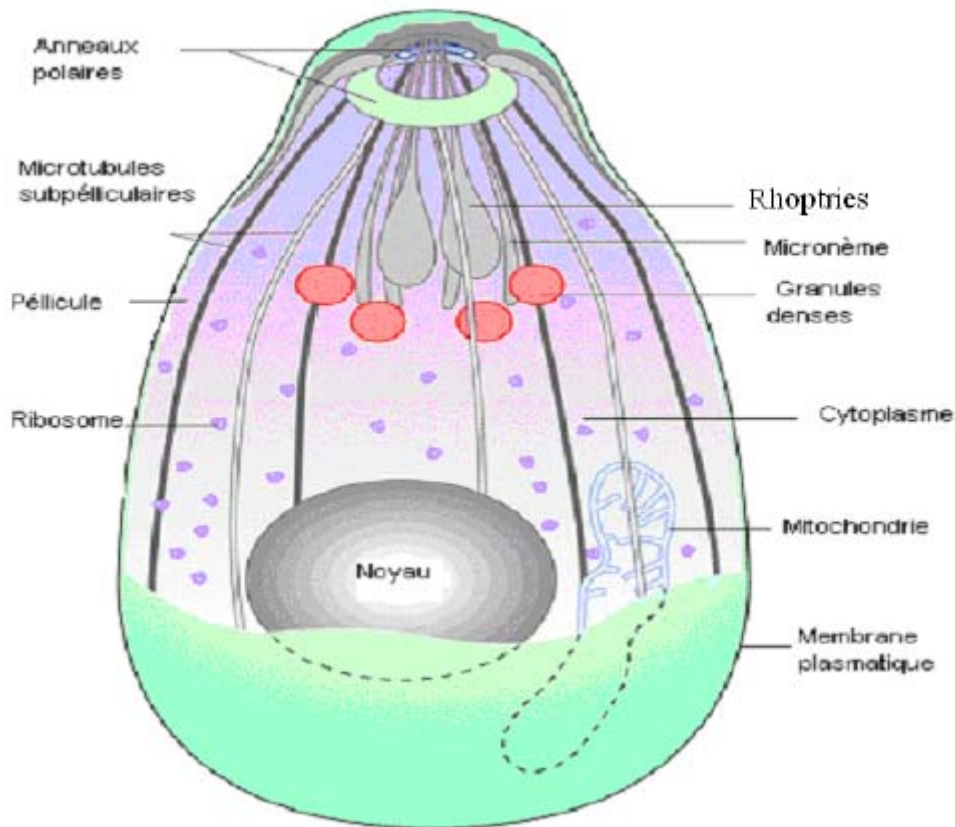


Figure 4 : Structure du *Plasmodium falciparum* (Bannister 1995)

IV.2. Le cytoplasme

Il est caractérisé par une forme en croissant et on y distingue aussi des protéases qui désagrègent l'hémoglobine en fractions indispensables à la croissance de l'hématozoaire

et des organites assurant différentes fonctions : ce sont les mitochondries, les ribosomes, les micronèmes, les rhoptries, les granules denses, les anneaux polaires qui interviennent dans l'invasion des hématies (Gratzer et Dluzewski 1993).

IV.3. Le noyau

Il est situé à la base du parasite. Il contient le génome du parasite constitué de quatorze chromosomes. On dénombre dans le noyau environ 5000 gènes qui codent pour la synthèse de différentes protéines dont certaines sont exprimées à la surface de la membrane plasmique.

V. DESCRIPTION CELLULAIRE DES STADES SANGUINS DE *P. FALCIPARUM*

P. falciparum se développe dans le globule rouge en 48 heures. Au cours de son cycle, il modifie la cellule érythrocytaire de sorte à en tirer ses nutriments et combattre les défenses de l'hôte, avant de s'échapper et d'envahir un nouveau globule rouge par un processus à multiples étapes. Ces événements sont reflétés par la morphologie constamment changeante du parasite (Bannister et Mitchell, 2003).

Le mérozoïte est une cellule adaptée morphologiquement et fonctionnellement à l'invasion de l'érythrocyte et à la formation de la vacuole parasitophore. Comme les autres stades invasifs (sporozoïte et ookinète), il a une courte durée de vie, il doit envahir un érythrocyte en moins de 10 minutes après avoir été libéré du schizonte. Brièvement extracellulaire, il est exposé au système immunitaire de l'hôte, c'est donc un stade important en terme de recherche immunologique. La surface du mérozoïte est recouverte d'un manteau poilu, qui lui permet d'adhérer aléatoirement puis de s'attacher au globule rouge. L'invasion est initiée par une interaction avec la cellule hôte par l'intermédiaire

des protéines de surface du mérozoïte comme les MSP (Chitnis et Blackman, 2000). Au pôle apical, se situe la machinerie nécessaire à l'invasion (d'où son appartenance aux Apicomplexa) c'est-à-dire les rhoptries, les micronèmes et les granules denses. Si la proéminence apicale touche l'érythrocyte, le mérozoïte se réoriente très rapidement et une jonction irréversible se forme impliquant l'intervention de protéines micronémales telles que l'Apical Membran Antigen 1 (AMA 1) (Narum et Thomas, 1994). Les trois organelles apicales déversent alors leur contenu séquentiellement lors de l'invasion et entraînent alors un changement de forme et de composition de la membrane érythrocytaire ainsi que la formation de la vacuole parasitophore (Chitnis et Blackman, 2000). Au pôle basal, le noyau se place à l'opposé de l'apex et est accompagné de la mitochondrie et du plastide qui se co-localisent avec un cytosquelette constitué de 2 à 3 microtubules adossés à 3 anneaux apicaux conférant au mérozoïte sa forme ovoïde. Entre les rhoptries et le noyau, une mine de ribosomes libres constitue une ressource pour la synthèse protéique accélérée au stade anneau.

P. falciparum est un organisme unicellulaire très petit, haploïde mais néanmoins un eucaryote compliqué, capable constamment de varier son expression génétique pour produire des formes phénotypiques différentes. Les caractéristiques structurales des différents stades de développement du *Plasmodium* constamment changeantes au cours de son cycle de vie sont autant d'indices révélateurs de la myriade de processus moléculaires subits au sein de l'organisme, reflétés par sa morphologie.

L'étude sur la biologie du parasite n'a réellement été développée que lorsque la culture in vitro des stades érythrocytaires a pu être établie en 1976 par Trager et Jensen (Trager et Jensen 1976). Il n'en reste pas moins que seule l'espèce *P. falciparum* peut être cultivée et que l'obtention des stades hépatocytaires, la production de sporozoïtes demeurent difficiles et laborieuses.

L'état des connaissances sur la biologie du parasite et la régulation de son cycle cellulaire reste très limité et le séquençage du génome récemment achevé constitue une avancée majeure pour l'étude et la lutte contre le parasite.

Au sein de ses deux hôtes, *P. falciparum* suit un programme de développement complexe et finement régulé pour générer une séquence de formes morphologiquement distinctes et exploite les environnements très différents dans lesquels il réside. Ce cycle compliqué nécessite de manière évidente une régulation coordonnée de l'expression des gènes.

VI. STRUCTURE MOLECULAIRE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *P. FALCIPARUM*

VI.1.La structure des gènes

En 1996, un effort concerté de la communauté scientifique internationale a permis de mettre sur pied un projet de séquençage et d'annotation du génome du clone 3D7 de *P. falciparum* (Hoffman *et al.*, 1997). Entre 1998 et 1999, les chromosomes 2 et 3 ont été entièrement séquencés (Gardner *et al.*, 1998; Bowman *et al.* 1999) et il faudra attendre fin 2002 pour la publication du génome complet, la totalité des séquences sont en libre accès avec néanmoins quelques parties à compléter (Gardner *et al.*, 2002).

Le génome du *P. falciparum* est composé de 22,8 mégabases (Mb) repartis en quatorze (14) chromosomes linéaires. Ces chromosomes représentent un total de 25 à 30 méga bases d'ADN, soit approximativement 5000 gènes.

Environ 60 % des protéines prédites, soit 3208 protéines, n'ont pas de fonction assignée par manque d'homologie suffisante avec les protéines d'autres eucaryotes, probablement lié à l'extrême richesse en (A+T). Cette proportion est bien plus importante que pour la plupart des génomes déjà séquencés. Mais, quelques protéines (5%) ont une

similitude avec des protéines putatives non annotées d'autres organismes. Un tiers des protéines prédites présentent au moins un domaine transmembranaire et 17.3 % possèdent un signal peptidique putatif (Barry, 2005).

La composition des nucléotides présente une forte richesse en Adénine (A) et en Thymine (T), en moyenne de 80,6 % du génome voire plus de 90 % pour les régions intergéniques et les introns et porte *P. falciparum* au premier rang des génomes riches en A+T devant *discoideum* (Glockner *et al.*, 2002). Cette particularité confère à l'ADN une grande instabilité et rend le génome difficile à manipuler.

La dimension des gènes de *P. falciparum* (taille moyenne, 2300 pb sans les introns présents à 54%) souligne une caractéristique importante du génome d'autant qu'aucun élément transposable n'a été identifié dans le génome. Les séquences sont plus largement enrichies en étendues A-T destinées à former des structures non-globulaires. Cette particularité introduit un biais par la présence de successions homo polymériques d'acides aminés (souvent asparagine) faisant apparaître des domaines globulaires à basse entropie ou basse complexité (souvent glutamate et glutamine) qui distingue *Plasmodium* des autres eucaryotes (excepté *D. Discoideum*) (Aravind *et al.*, 2003).

Bien que la taille du génome de *P. falciparum* soit considérablement plus importante que chez les levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*, un nombre comparable de gènes (5300) a été prédit. A capacité codante équivalente, la différence de taille entre les génomes est reflétée par la taille des protéines parfois jusqu'à 50% plus grande que les protéines orthologues de levure et en contraste avec ce qui est observé chez *Encephalitozoon*.

Le génome code pour 43 ARN de transfert (ARNt) représentant l'ensemble des anticodons. Chez la plupart des Eucaryotes séquencés jusqu'à aujourd'hui, les gènes codant les ARNt sont assez redondants, mais le génome de *P. falciparum* ne semble pas

comporter de répétitions de gènes codant pour les ARNt. *P. falciparum* partagerait cette organisation avec d'autres protozoaires parasites comme un autre apicomplexe, *Cryptosporidium parvum* et la microsporidie *Encephalitozoon cuniculi*.

De la même manière que chez *Cryptosporidium parvum* et contrairement à de nombreux eucaryotes, les gènes codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) sont peu nombreux et non répétés en tandem et les unités codant pour les ARNr 5.8 S, 18 S et 28 S sont distribués sur plusieurs chromosomes.

Les plus polymorphiques de ces gènes, entre autres les gènes de surface des merozoïtes sont largement utilisés comme marqueurs génétiques dans les enquêtes épidémiologiques investiguant sur la diversité génétique des souches de *P. falciparum* (Babiker *et al.* 1997; Snounou and Beck 1998). Ce sont particulièrement les gènes codant pour des protéines du même nom: *merozoïte surface protein-1 (msp-1)*, *merozoïte surface protein-2 (msp-2)*, *merozoïte surface protein 3 (msp-3)*, *le glutamate-rich protein (glurp)*, *circumsporozoïte protein (csp)* *erythrocyte binding antigen-175 (eba-175)*, *apical membran antigen 1 (ama-1)*. Plusieurs mécanismes sont évoqués dans le polymorphisme génétique de *P. falciparum*: la duplication génique, la conversion, la translocation, les délétions et les insertions géniques (Kemp 1992; Deitsch *et al.* 1997). Aussi, les recombinaisons intragéniques qui se produisent généralement dans les segments répétitifs du gène conduisent à des motifs différant par leur taille et ceci, d'une souche plasmodiale à une autre (Meyer *et al.* 2002). Ce polymorphisme a comme conséquence que les individus au sein de l'espèce soient différents les uns des autres. Il a aussi comme conséquence que les individus au sein d'un hôte soient différents.

VI.2. Le gène *merozoïte surface protein-1 (msp-1)*

Le gène *merozoïte surface protein-1 (msp-1)* situé sur le chromosome 9 de *P. falciparum* (Triglia *et al.*, 1992) peut être divisée en 17 blocs plus ou moins conservés entre les souches de *P. falciparum* (Marcelo *et al.*, 2003).

Le bloc 2 constitue une exception au dimorphisme car en plus des familles alléliques K1 et MAD20, est fréquemment trouvée dans ce bloc une troisième famille d'allèles nommée RO33 (figure 5). Ce gène code pour la synthèse d'une protéine mérozoïtique de surface de grande taille (185-200 KDa) fortement impliquée dans l'invasion de l'érythrocyte.



Figure 5 : Représentation schématique du gène *msp-1* de *P. falciparum* montrant les 17 domaines (Miller, 1993)

VI.3. Le gène *merozoïte surface protein-2 (msp-2)*

Le gène *merozoïte surface protein 2 (msp-2)*, présent sur le chromosome 2, a été isolé et séquencé (Thomas *et al.*, 1990; Fenton *et al.* 1991; Smyth *et al.* 1991; Marshall *et al.* 1994) à partir de plusieurs souches de *P. falciparum*. Ce gène, très polymorphe, code pour la synthèse d'une protéine du même nom située la surface du méozoïte (Abu Bakar. 1997).

Il présente une structure en 5 blocs de séquences (figure 6) comportant 345 résidus acides aminés (aa) (Snewin *et al.*, 1991).

Les blocs 1, 2, 4 et 5 du gène possèdent une structure stable tandis que le bloc 3 comporte une région variable dimorphique pouvant être classée entre deux familles alléliques sur la base des séquences qui sont :

La famille Indochina 1 IC1 (ou 3D7) caractérisée par une courte séquence (glycine-serine-alanine) répétée de 4 à 8 résidus acides aminés.

La famille FC27 pauvre en glycine-serine-alanine mais contenant une ou plus d'une copie répétée d'une séquence de 32 acides aminés (Snewin *et al.*, 1991)

Acides Aminés

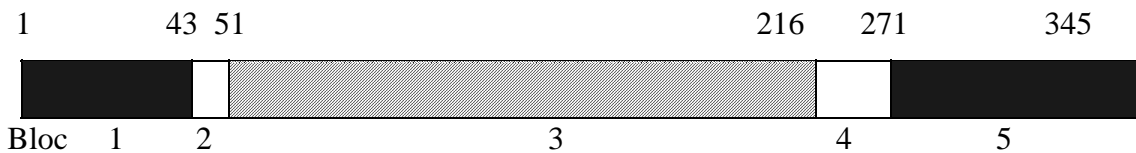


Figure 6 : Diagramme schématique du gène *msp-2* illustrant les blocs 1 à 5 (Snewin 1991)

VI.4 Le gène *erythrocyte binding antigène-175 (eba-175)* de *P. falciparum* : structure et fonctions

Le gène *Erythrocyte Binding Antigen-175 (eba-175)* est composé de 7 régions (region I-VII) et possède 2 segments riches en cystéine (F1 and F2) situés dans la partie N-terminale de la région II (figure 7). Ces segments riches en cystéine, F1 et F2, sont responsables de liaison de la glycophorine A à la membrane de l'érythrocyte et contiennent un nombre très faible de sites polymorphiques. La région III du gène *eba-175* est localisée au niveau de la partie centrale du gène. Des études génétiques de deux souches de *P. falciparum* soulignent la présence au niveau de cette région de deux segments hautement polymorphiques dénommés FCR3 et CAMP (Sim *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 2001; Toure *et al.*, 2001). Les deux segments sont insérés à différentes positions de la région III et diffèrent de 27 amino acides de long. Les deux allèles sont tous deux conservés et les mérozoïtes de *P.falciparum* qui sont haploïdes peuvent posséder un des allèles mais pas les deux. Le rôle de l'antigène *eba-175* dans l'interaction hôtes parasites n'est pas très bien connu. Certaines études ont montré que les

interactions moléculaires initiales du parasite avec la membrane érythrocytaire impliqueraient une liaison de la région II (domaine conservé) à la glycophorine.

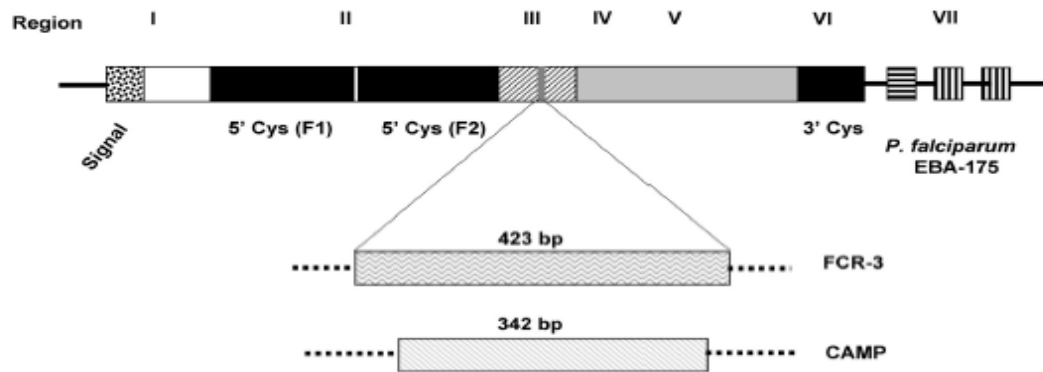


Figure 7: Structure du gène Erythrocyte Binding Antigen de *Plasmodium falciparum* présentant la région divergente III composée des segments FCR3 et CAMP

CHAPITRE II :
MATERIEL ET METHODES

I. SITES D'ETUDE

Les données de cette étude ont été collectées chez des enfants de moins de cinq ans vivant dans différents villages situés dans les districts sanitaires de Pissy, Saponé et Tenkodogo.

Les données portant sur l'analyse de la diversité génétique de *P.falciparum* entre milieu urbain et milieu rural ont été collectées respectivement dans les districts sanitaires de Pissy et de Saponé (village de Balonghin). Les données sur l'analyse de la diversité génétique de *P.falciparum* en fonction du niveau de transmission ont été collectés dans quatre villages (Dawelgué, Kounda, Tanghin et Watenga) du district sanitaire de Saponé tandis que celles évaluant la diversité génétique en fonction du profil clinique ont été collectées dans le district sanitaire de Tenkodogo (CHR de Tenkodogo et dans les villages de Zano et Gourganbaga). Le choix des différents sites de l'étude a été guidé essentiellement par les relations déjà établies par le CNRFP avec les populations des différentes localités et les responsables des structures sanitaires. En outre, le choix de la province du Boulgou était renforcé par l'existence à la fois du Centre Hospitalier de Tenkodogo où les cas de paludisme graves notamment anémiques mais aussi par l'accessibilité géographique par rapport à Ouagadougou et au CNRFP pour le transfert des échantillons biologiques.

I.1. Le district sanitaire de Pissy

Le district sanitaire de Pissy constitue avec le district sanitaire du secteur 30, le district sanitaire de Kossodo et le district sanitaire de Paul VI, les quatre districts sanitaires de la région sanitaire du Centre (Figure 8). C'est un district sanitaire urbain qui regroupe un Centre Médical avec Antenne Chirurgical et 25 Centres de Santé et de Promotion Social

(CSPS) et une dizaine de formations sanitaires privées. Sa population était estimée en 2008 à environ 638.234 habitants dont 19,2 % d'enfants de moins de 5 ans (DEP 2009).

Sur le plan climatologique, le district sanitaire de Pissy se situe dans la zone Soudanienne avec deux principales saisons: une longue saison sèche de novembre à mai et une courte saison pluvieuse de juin à Octobre. A l'instar du reste du pays, le paludisme y sévit de façon endémique avec un pic pendant la saison pluvieuse. Les habitations sont essentiellement en matériau de construction durable amélioré (ciment) avec des toitures en tôles.

Le taux d'inoculation entomologique (EIR) est estimé à moins de 10 piques infectantes//personne/année (Esposito *et al.* 1988).

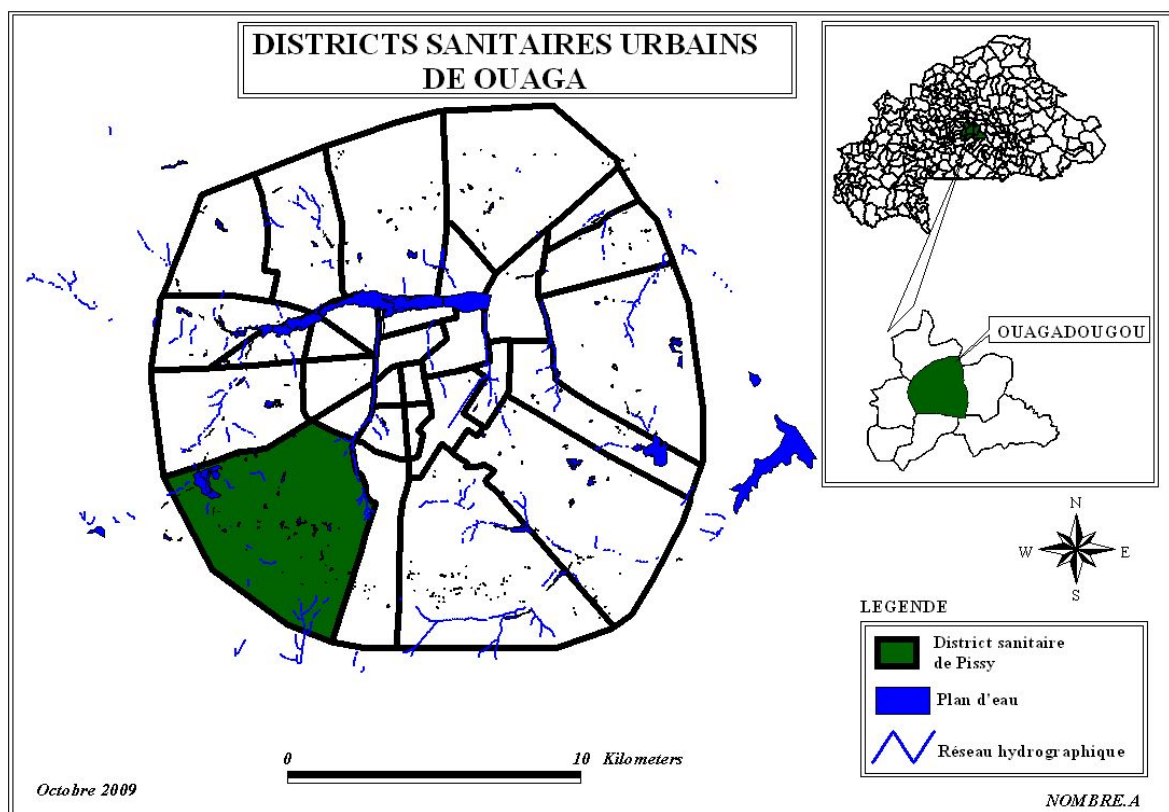


Figure 8 : Carte présentant les districts urbains de Ouagadougou

I.2. Le district sanitaire de Saponé.

Le district sanitaire de Saponé (figure 9), l'un des quatre districts de la région sanitaire du Centre Sud a une population estimée en 2008 à 99.114 habitants dont 19020 enfants de moins de 5 ans (DEP 2009). Cinq villages, Balonhin, Kounda, Dawelgué, Tanghin et Watenga localisés dans l'aire du district sanitaire de Saponé, ont été les sites de collecte des échantillons (Figure 9).

La transmission du paludisme est péri-annuelle avec des variations saisonnières dans le district. Le pic de la transmission est observé durant la saison pluvieuse (de Mai à Octobre). Le taux d'inoculation entomologique dans la région a été évalué à 200 piqûres infectantes/personne/année (Nebie *et al.*, 2008).

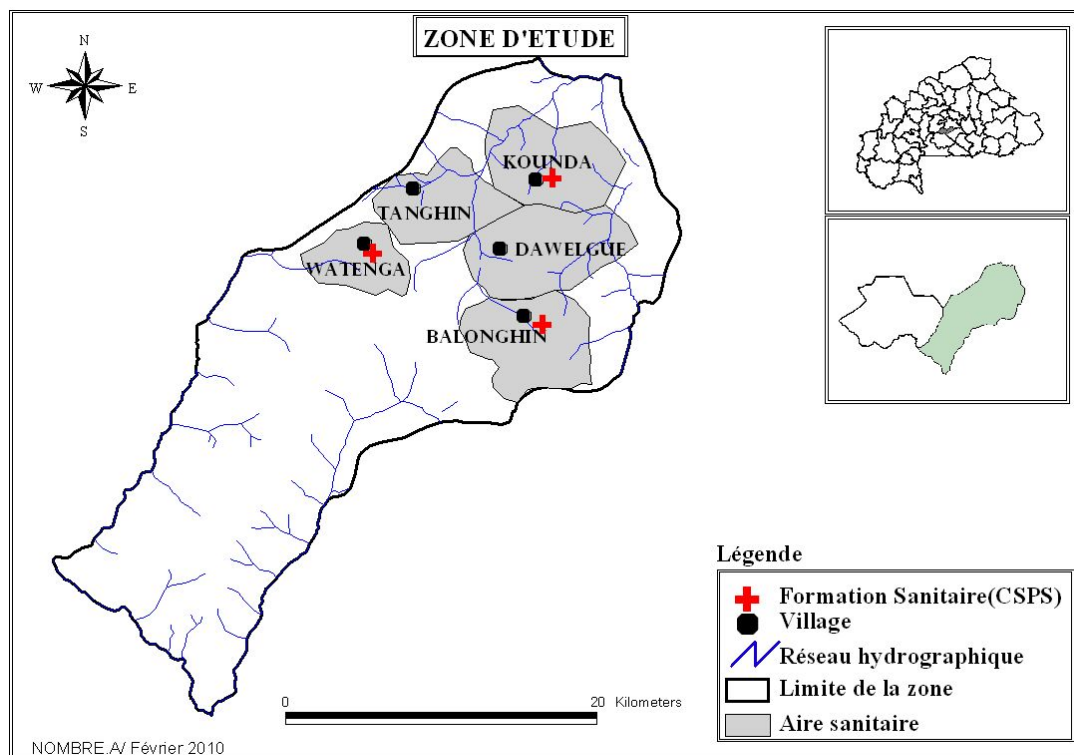


Figure 9: Carte présentant les villages d'étude du district sanitaire de Saponé

L'incidence des cas de paludisme chez les enfants de moins de cinq ans vivant dans le district sanitaire a été estimée en 2007 à 0,7 épisode/enfant/année à risque (Sirima *et al.*, données non publiées).

D'une manière générale, les habitations dans les villages sont essentiellement en banco avec des toitures en paille

En 2003, la prévalence du paludisme chez les enfants de moins de cinq ans était de 37.6% et 43,9 % respectivement dans le district sanitaire de Pissy et de Saponé (Sirima *et al.*, 2003).

I.3. Le district sanitaire de Tenkodogo

Le district sanitaire de Tenkodogo, dans la province du Boulgou située au sud-est du Burkina Faso (Figure 10). En 2008, la population était estimée à 183.527 habitants dont 35.219 enfants de moins de 4 ans (DEP 2009).

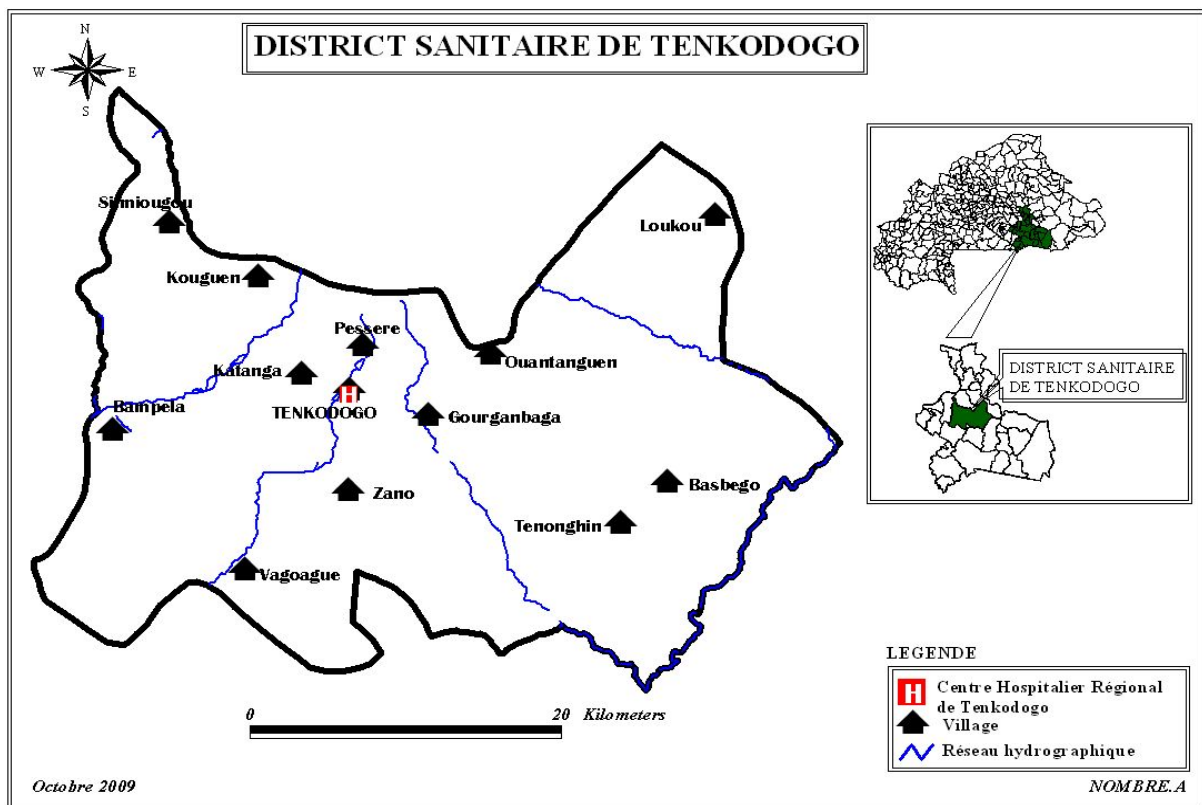


Figure 10: Site d'étude (District Sanitaire de Tenkodogo) centré sur le CHR de Tenkodogo et les villages de Zano et Gourganbaga.

Le climat est du type soudano sahélien et la transmission du paludisme dans cette région hyper endémique est intense en saison pluvieuse (juin à octobre), faible en saison sèche (novembre à mai).

I.4. Le Centre National de Recherche et Formation sur le Paludisme (CNRFP)

Le Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP), spécialisé dans la recherche sur le paludisme comprend en son sein, outre l'administration, plusieurs sections spécialisées: la section d'immuno-parasitologie, la section de biologie moléculaire, la section d'entomologie et la section santé publique. C'est au sein de l'unité de génétique parasitaire de la section d'immuno-parasitologie que les échantillons prélevés ont été traités et analysés.

II. TYPE ET PERIODE D'ETUDE

Il s'est agi de :

- ✚ Une étude comparative transversale sur des échantillons collectés de septembre à novembre 2001 au CHR de Tenkodogo et dans deux villages du district sanitaire de Tenkodogo pour l'analyse de la diversité génétique en fonction du profil clinique
- ✚ Une étude longitudinale d'efficacité thérapeutique de 28 jours conduite de Septembre à Décembre 2003 suivant le protocole OMS 1996 modifié (WHO 2002) au cours de laquelle des prélèvements sanguins sur papier filtres ont permis par la suite d'analyser la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* entre milieu urbain et milieu rural
- ✚ Deux enquêtes transversales réalisées en 2007 en saison de faible et de forte transmission de paludisme au cours de laquelle des prélèvements sanguins sur papier filtres ont permis d'analyser la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* en fonction du niveau de transmission

III. POPULATION D'ETUDE

III.1. Estimation de la taille d'échantillon

Pour évaluer la diversité génétique en fonction du profil clinique, nous avons supposé que la fréquence des familles alléliques du gène *merozoïte surface protéine-2* (MSP-2) dans les cas de paludisme grave anémique est de 67 % (Ntoumi *et al.*,2001), que la différence entre la fréquence des cas de paludisme grave anémique et les autres formes cliniques est de 50 %, si nous voulons mesurer cette différence avec une puissance de 80 % au seuil de 5 %, il nous faudra au moins 99 patients par entité

clinique soit $n = 99 \times 3 = 297$ patients pour valider nos résultats selon les calculs statistiques.

Dans le but d'analyser la diversité génétique en fonction du milieu (urbain ou rural), la taille d'échantillon a été calculée en supposant que les fréquences des familles alléliques des gènes *merozoite surface protéine-1 (msp-1)* et *merozoite surface protéine-2 (msp-2)* en milieu rural était de 65 % (Issifou *et al.*, 2001) et que la différence avec le milieu urbain est de 20%. Si nous voulons mesurer cette différence avec une puissance de 80 % au seuil de 5 %, il nous faudra au moins 71 patients par zone d'étude soit $n = 71 \times 2 = 142$ patients pour valider nos résultats selon les calculs statistiques.

Le calcul de la taille de l'échantillon pour l'évaluation de la diversité en fonction de la saison de transmission a été fait pour chacun des formes alléliques du gène *eba-175* en comparant leur fréquence entre saison de forte et de faible transmission. Ce calcul a été fait en utilisant un test bilatéral avec un risque alpha de 0,05, une puissance de 80%. En effet, en considérant une fréquence de 42% pour les formes alléliques CAMP en saison de faible transmission (Toure 2006) et de 58 % en saison de forte transmission (Toure 2001), l'échantillon nécessaire est de 157 patients par groupe. Aussi, la taille définitive pour l'échantillon de notre étude sera au moins de 157×2 , soit 314 sujets pour permettre une interprétation statistique de nos variables.

III.2. Critères d'inclusion

Les sujets inclus dans nos différentes évaluations étaient des enfants de 0 à 5 ans vivant dans le district sanitaire de Pissy, Saponé et Tenkodogo remplissant les critères suivants :

- Age de 6 mois à 59 mois inclus
- Accepter résider dans la zone d'étude durant la période de l'étude
- Consentement éclairé du parent ou du tuteur de l'enfant

En plus des critères généraux, des critères spécifiques ont été élaborés pour les différentes évaluations. Ainsi, pour l'analyse de la diversité génétique en fonction du profil clinique, les définitions opérationnelles suivantes ont été retenues:

Paludisme grave anémique :

A été considéré comme cas de paludisme grave anémique, tout enfant présentant un ou plusieurs des signes ou symptômes suivants associés à la présence d'une forme asexuée de *P. falciparum* et à un taux d'hémoglobine inférieur à 5g/dl :

- Coma irréductible sans autre cause ;
- Convulsions généralisées et répétées ;
- Anémie sévère (taux d'hémoglobine inférieur à 5g/dl) ;
- Insuffisance rénale aiguë (diurèse < 12ml /kg /24 h chez l'enfant, créatinémie >265 µmol/l) ;
- Oedème aigu des poumons (OAP) ou détresse respiratoire (DR) ;
- Hypoglycémie sévère (glycémie < 0.40 g/l) ;
- Collapsus cardio-vasculaire ou état de choc (pression artérielle systolique < 60mmHg chez l'enfant de 1 à 5 ans ;
- Hémorragie spontanée et prolongée ;
- Prostration ;
- Acidose sanguine (pH artériel < 7,25 ou bicarbonates < 15 mmol /l) ;
- Ictère (clinique ou bilirubine > 50µmol/l ou >30 mg/l) ;
- Hyperthermie (Température > 41°C) ;

Paludisme grave non anémique :

A été considéré comme cas de paludisme grave non anémique tout enfant présentant un ou plusieurs des signes ou symptômes ci-dessus cités associés à la présence d'une forme asexuée de *P. falciparum* et à un taux d'hémoglobine supérieur ou égal à 5g/dl.

Paludisme non grave :

A été considéré comme cas de paludisme non grave, tout enfant présentant des formes asexuées de *P. falciparum* dans le sang périphérique sans un signe de gravité de paludisme. Font partie de ce groupe les cas de :

Paludisme asymptomatique :

A été considéré comme cas de paludisme asymptomatique, tout enfant ayant une température axillaire inférieure à 37,5° C sans un signe ou symptôme du paludisme mais associée à la présence d'une forme asexuée de *P. falciparum* dans le sang périphérique.

Paludisme simple :

A été considéré comme cas de paludisme simple, tout enfant ayant une température axillaire supérieure ou égale à 37,5° C associée à la présence d'une forme asexuée de *P. falciparum* dans le sang périphérique sans signes de gravité du paludisme.

Certains enfants ont été exclus de l'étude. Ce sont les enfants qui au moment du prélèvement avaient des causes de fièvre autres que le paludisme et ceux dont le tableau clinique au moment du prélèvement évoquaient une infection palustre mais dont l'examen parasitologique au laboratoire était négatif.

III.3. Critères de non inclusion

Certains enfants ont été exclus de l'étude. Ceux ne remplissant pas les critères d'inclusion mais aussi les enfants qui au moment du prélèvement avaient des causes de fièvre autres que le paludisme.

IV. COLLECTE DES DONNEES

IV.1. Les prélèvements

Pour chaque enfant inclus dans l'étude, des prélèvements sanguins (pour la goutte épaisse - frottis sanguin et le génotypage du parasite) ont été effectués à la pulpe du doigt. Les prélèvements effectués sur papiers filtres (spots de sang) ou dans certains cas des prélèvements veineux ont été utilisés pour l'étude de la diversité génétique de *Plasmodium falciparum* tandis que les étalements sur lames porte-objet ont servi au diagnostic microscopique. Dans le cadre de l'analyse de la diversité génétique en fonction du profil clinique, le prélèvement à la pulpe du doigt a servi à la mesure du taux d'hémoglobine sur le terrain à l'aide d'hémoglobinomètre portatif.

IV.2. Examen microscopique des parasites

Pour l'examen parasitologique, nous avons effectué une goutte épaisse et un frottis mince. Le frottis a été fixé au méthanol. Les lames ont été ensuite colorées au Giemsa 5% pendant 45 minutes, puis séchées et lues à l'objectif 100x du microscope sous huile à immersion.

Les densités parasitaires (DP), exprimées en nombre de parasites par microlitre (μl) de sang ont été calculées à partir de la lecture des gouttes épaisses selon la méthode suivante: le nombre de parasites par microlitre de sang dans une goutte épaisse est établi par rapport au nombre de leucocytes, fixé à 8.000 par microlitre de sang. Nous avons utilisé deux compteurs manuels : un pour les parasites et l'autre pour les leucocytes. Pour avoir donc le nombre de parasites / μl (DP), on compte un nombre n de parasites pour un nombre X de leucocytes comptés en même temps, soit la formule suivante : $DP = (\text{nombre parasites comptés } n \times 8.000) / X$.

Si le nombre de parasites n est ≥ 10 on compte au moins $X = 200$ leucocytes et en même temps le nombre de parasites (trophozoites, schizontes, gamétocytes).

$$DP = n \times 8.000 / 200 = n \times 40$$

Si le nombre de parasites n est < 10 , on compte au moins $X = 500$ leucocytes et la densité parasitaire sera :

$$DP = n \times 8.000 / 500 = n \times 16$$

Les lames dont la goutte épaisse s'est avérée défectueuse ont été examinées seulement au niveau du frottis mince et la densité parasitaire calculée à partir du frottis.

En estimant à 200 en moyenne le nombre de globules rouges (GR) par champ microscopique et à 4.000.000 le nombre d'hématies par microlitre de sang, l'expression de la DP est la suivante :

$$DP = \frac{\text{Nombre de GR parasités} \times 4.000.000}{\text{Nombre de champs examinés} \times 200}$$

Le frottis a servi par ailleurs à l'identification de l'espèce plasmodiale et des stades parasitaires.

IV.3. Techniques d'analyse moléculaires : la Polymerase Chain Reaction (PCR)

IV.3.1. Extraction de l'Acide désoxyribonucléique (ADN)

Différentes techniques d'extraction et de purification de l'ADN parasite ont été utilisées au cours de cette étude:

- ✚ La technique au Chelex (Plowe *et al.*1995) en utilisant comme réactifs de la saponine à 10%, une solution de phosphate buffered saline (PBS) 1X et du Chelex-100.

✚ L'extraction et la purification de l'ADN parasite en utilisant des kits Qiagen selon le protocole du fournisseur.

L'extraction de l'ADN à partir du prélèvement veineux sur EDTA (anticoagulant) a été effectuée selon la technique DTAB-CTAB (Dodecyl Triméthyl Ammonium Bromide- Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide). Cette technique de dénaturation / précipitation utilisant des sels triméthyl-ammonium bromide donne d'excellents résultats quant à la qualité de rendement de l'ADN extrait (Gustincich *et al.*1991). Nous l'avons légèrement modifiée en ajoutant un traitement préalable du sang avec 1% de saponine pour permettre une meilleure lyse des globules rouges afin de s'assurer de la libération de l'ADN du parasite présent dans les globules rouges. L'ADN extrait dans tous les cas est soit utilisé directement ou conservé à -20°C pour les amplifications ultérieures.

IV.3.2. Amplification des extraits d'ADN par la PCR

Les régions polymorphiques répétitives du bloc 2 du *mrozoite surface protein-1* (*msp-1*), du bloc 3 de *merozoite surface protein-2* (*msp-2*) ont été amplifiées par une nested PCR pour étudier le polymorphisme de *P. falciparum* (Viriyakosol *et al.*,1995) de même que la région dimorphique III localisée dans la partie centrale du gène *eba-175* (Toure *et al.*2001) afin d'étudier le polymorphisme allélique de *P. falciparum*.

Il s'est agi d'une nested PCR utilisant au cours de la première amplification un premier couple d'amorces qui amplifient le segment du gène comprenant la région de polymorphisme ; un second couple d'amorces spécifiques aux différentes familles alléliques pour ce qui concerne *msp-1* et *msp-2*: soit K1, Mad 20 et RO33 pour *msp1* et FC27 et 3D7 pour *msp2* (voir liste et séquences des amorces à l'Annexe 1) *eba-3* et *eba-4* pour *eba-175*, est utilisé pour la seconde amplification.

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube pour un volume total de 25µL au cours de la phase de préparation du mélange ou mix pour amplification. Cette phase se déroule sous une hotte différente de celle ayant servi à l'extraction de l'ADN et préalablement stérilisée par UV afin de neutraliser tous les fragments d'ADN liés aux manipulations antérieures. Les éléments constitutifs du mélange et leurs concentrations utilisées au cours des deux réactions composant la nested PCR sont résumés dans le tableau II. Au cours de la première réaction 1-5 µL d'ADN extrait pour un volume total de 25 µL. La seconde réaction a consisté à utiliser 1-5 µL de la première amplification tout en gardant les mêmes concentrations pour les autres réactifs.

Toutes les réactions ont été réalisées dans un thermocycler selon le programme d'amplification (Tableau III)

Tableau II : Composition du mélange pour amplification (mix)

Produits	Co	Cf	Mix x(n+3) µL*
-Tampon PCR buffer	10x	1,5 mM	
- Dntp	25mM	200µM	
-MgCl ₂	25mM	1,5 mM	
- Primers (amorce) A	10µM	1µM	
-Primers (amorce) B	10µM	1µM	
-Taq polymérase(enzyme)	5UI/µL	0,5 UI	
- H2O stérile: qsp 20µL	-		
- Echantillon d'ADN	-	1-5µL	
Volume final			

Co: Concentration initiale ; **Cf** : Concentration finale

*A chaque manipulation, un calcul du volume nécessaire pour chaque réactif est indispensable. Ce calcul est toujours fait sur **n + 3** :

n étant le nombre d'échantillons à analyser. Les trois échantillons supplémentaires se composent de : 1 témoin négatif constitué contenant de l'eau stérile (eau pour

préparations injectables) ; 1 contrôle positif constitué d'un extrait reconnu positif. Le troisième échantillon supplémentaire permet d'éviter de se retrouver avec un volume insuffisant pour le dernier échantillon en prenant en compte les éventuelles pertes liées au pipetage.

La préparation du mix est suivie immédiatement de l'amplification qui se fait de façon automatisée suivant les 3 étapes ci-dessous caractérisées:

L'étape de dénaturation : Elle se déroule à (+) 94°C et dure 5 minutes pour le premier cycle (il s'agit de dénaturer l'ADN de grande taille) et 2 secondes pour les cycles suivants.

L'étape d'hybridation des amorces ou "annealing": La température d'hybridation varie selon les amorces utilisées (tableau III). La durée est d'environ 1 minute 30 secondes, juste le temps aux amorces de s'hybrider correctement, l'ADN total plus long n'aura pas le temps de se réhybrider.

L'étape d'élongation : La température d'élongation, (+) 72°C est la température optimale de la Taq polymérase. La durée de cette phase est de deux (02) minutes environ.

Tableau III: Températures de dénaturation, d'hybridation, d'élongation et nombre de cycles selon les différentes amorces (primers)³

<i>Amorces</i>	Temperature dénaturation (°C)	Température d'hybridation (°C)	Température d'élongation	Nombre de cycles
<i>msp -1 amorces</i>				
Première amplification	94	55	72	30
<i>Seconde amplification</i>				
K1A+K1B	94	62	72	25
RO33A+RO33B	94	62	72	25
MAD 20 A+MAD20B	94	58	72	25
<i>msp-2 amorces</i>				
Première amplification (1+4)	94	55°	72	32
<i>Seconde amplification (FC27A+ FC27 B ; 3D7 A+ 3D7 B)</i>				
	94	57°	72	30
<i>eba-175 amorces</i>				
Première amplification <i>eba1 + eba2</i>	94	56	72	28
<i>Seconde amplification</i>				
<i>eba3 et eba4</i>	94	56	72	24

³ Voir liste et séquences des amorces en annexe I

Dans le cadre de cette étude, les schémas suivants ont été retenus pour la procédure d'amplification des extraits d'ADN avec les différents marqueurs de polymorphisme (figure 11a, 11b et 11c).

Schéma de typage des familles alléliques du gène *msp-1*

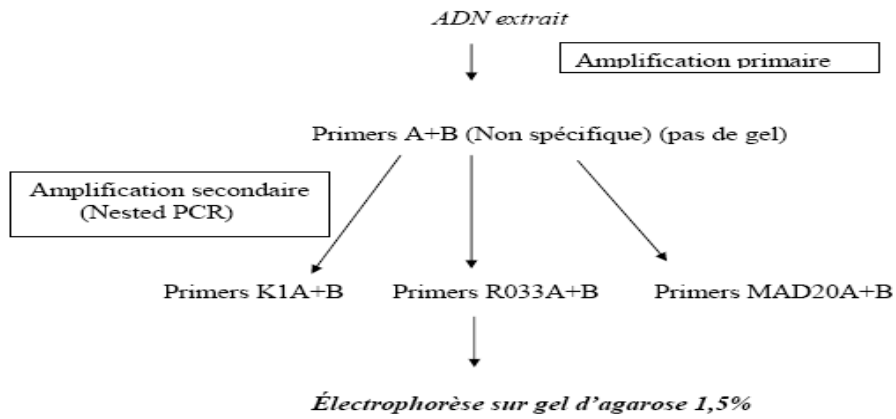


Figure 11a : Schéma de typage des familles d'allèles *msp-1*

Schéma de typage des familles alléliques du gène *msp-2*

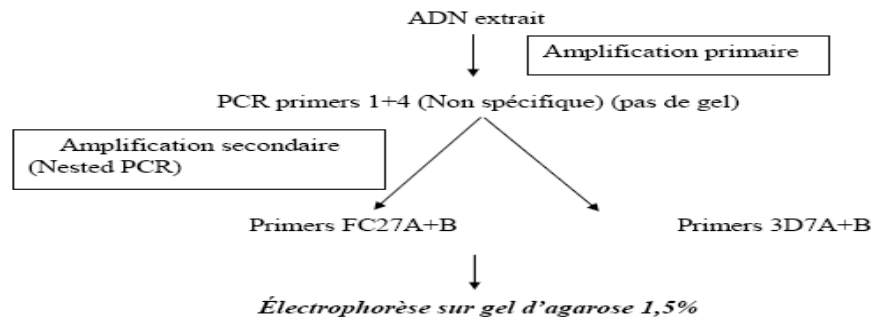


Figure 11b : Schéma de typage des familles d'allèles *msp-2*

Schéma de typage des allèles du gène Erythrocyte Binding Antigen (*eba-175*)

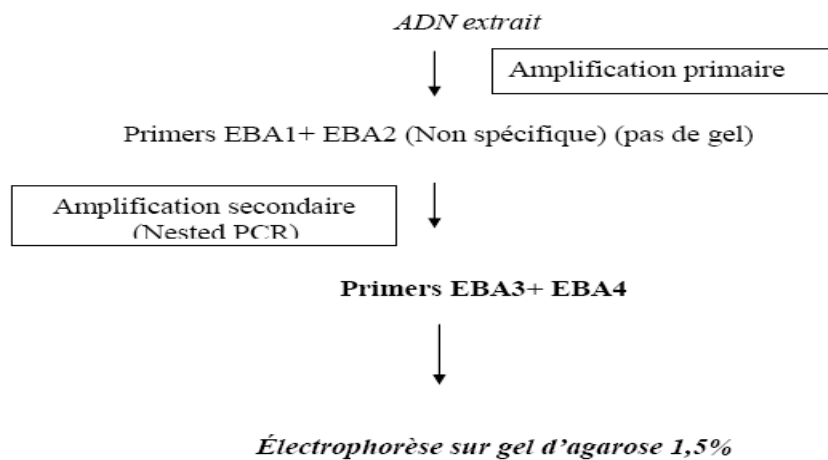


Figure 11c : Schéma de typage des familles d'allèles *eba-175*

IV.3.3. Electrophorèse des extraits amplifiés

Les fragments d'ADN obtenus par la PCR sont en quantité telle qu'il est possible de les révéler directement par électrophorèse sur gel d'agarose (Agarose type I-A) à 1,5% pendant 1h à 1h30 minutes à 100 Volts en utilisant du bromure d'éthidium (BET). Le BET est un produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques. Il présente une fluorescence orange sous illumination par des UV courts de longueur d'ondes d'environ 300 nm.

La vitesse de migration étant dépendante de la masse moléculaire, les fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille exprimée en paires de bases. Leur identification est facilitée par l'utilisation de marqueur de poids moléculaire (annexe 2a, 2b). La révélation de l'électrophorèse a été faite sous UV en utilisant un système de documentation des images couplé à un ordinateur donnant la possibilité d'estimer avec précision la taille exacte des bandes d'ADN.

IV.3.4. Contrôle de qualité et Interprétation des résultats

Des contrôles positifs de P. falciparum fournis par MR4, ATCC® Manassas en Virginie ont été utilisés simultanément au cours de toutes les réactions d'amplification.

Une bonne réaction se traduit par la présence de bandes correspondant soit à un intervalle de paires de bases couvrant les tailles des fragments appartenant aux fragments amplifiés (annexe 2a), soit correspondant à une taille bien précise (cas des fragments F-CR3 et CAMP) de eba-175 (annexe 2b). La polyclonalité se traduisant par la présence simultanée dans le même extrait des bandes de tailles différentes, car chaque bande représentant un clone ou un allèle.

Pour chaque patient inclus, les résultats de l'amplification sont analysés et interprétés en fonction de chaque marqueur de polymorphisme (*msh-1*, *msh-2*, *hpa-175*).

Conformément à des études antérieures nous avons retenu les définitions suivantes pour ce qui concerne *msh-1* et *msh-2*:

Deux allèles *msh-1* ou *msh-2* sont considérés identiques lorsqu'ils diffèrent de seulement 10 paires de base (Cattamanchi *et al.*2003).

V. CONSIDERATIONS ETHIQUES

Toutes ces différentes évaluations ont reçu l'approbation du Ministère de la santé du Burkina Faso. En outre, un consentement éclairé écrit a été obtenu auprès de chaque parent / tuteur des enfants de l'étude. Tous les frais de consultations, de laboratoires et de traitement des sujets inclus dans l'étude ont été pris en charge.

L'analyse de la diversité génétique en fonction de la saison de transmission fait partie d'une étude épidémiologie dont le protocole (DMID 06-0020) a été revu par l'Office of Clinical Research Affairs (OCRA) de la Division de Microbiologie et des Maladies Infectieuses au sein du Département National de Santé de Publique des Etats Unis d'Amérique. Le protocole a, en outre été approuvé par le comité d'éthique national de recherche en santé du Burkina Faso.

Au cours de toutes les analyses au laboratoire nous avons garanti l'anonymat des patients par l'utilisation de codes.

VI. GESTION ET ANALYSE DES DONNEES

Les données ont été saisies et validées sur micro ordinateur à l'aide du logiciel Excel 2000 et analysées par le logiciel EPI INFO 6.04. En outre, le logiciel Excel 2000 a été utilisé pour les représentations graphiques.

Pour l'analyse de la diversité en fonction du niveau de transmission les données sur la population allélique ont été analysées par les logiciels Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) et EPI INFO 6.04.

Pour permettre une analyse comparative de la fréquence des allèles entre les deux saisons de transmission indépendamment de la localisation géographique des villages, les données des quatre villages ont été regroupées par saison. Par contre, pour analyser l'influence de la localisation géographique ou de la saison de transmission sur les variations qui pourraient être observées, les données ont été organisées en 8 populations et 4 groupes. Chaque groupe représente un village alors que chaque population représente une subdivision des données en saison de forte ou de faible transmission, de telle sorte que chaque groupe comporte deux populations. L'analyse dans ce cas précis a été faite par l'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) en exécutant le programme Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier *et al.*, 2005). Les variables suivantes ont été utilisées : V_a estime la part de variation due à la saison de transmission, V_b estime la part de variation due à la saison de transmission au niveau de chaque village et enfin V_c calcule la proportion de variation attribuée à chaque combinaison village/saison de transmission dans la population d'étude. Nous avons utilisé Arlequin avec 10.000 permutations pour l'AMOVA et les populations étaient considérées significativement différentes pour un $P < 0,05$ (Excoffier *et al.*, 2005).

Pour analyser la différenciation génétique (c'est-à-dire le degré de flux génétique entre population parasite pouvant expliquer leur ressemblance ou leur dissemblance) basée sur la méthode d'évaluation de la distance génétique entre les 4 villages de la zone d'étude, les valeurs F_{ST} (rangées de 0-1) ont été déterminées et les résultats interprétés selon les règles de Sewall Wright (Hartl et Clark, 1989). Brièvement une valeur F_{ST} :

- comprise entre 0 et 0,05 indique une faible différenciation génétique

- comprise entre 0,05 et 0,150 indique une différenciation génétique modérée;
- comprise entre 0,15 et 0,25 indique une différenciation génétique importante;
- $> 0,25$ indique une très importante différenciation génétique.

Enfin, nous avons évalué la diversité génétique (probabilité que deux allèles choisis au hasard soient différents dans une population (Nei, 1987) en déterminant les indices standards de diversité.

En outre, les tests statistiques suivants ont été utilisés pour l'analyse de toutes les données de l'étude :

- Le khi-carré de Pearson pour la comparaison des proportions
- Le test de Fisher pour la comparaison des proportions lorsque l'effectif théorique est inférieur à 5 dans une colonne.

La valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme seuil de significativité et tout intervalle de confiance estimée à 95 %.

CHAPITRE III : RESULTATS

I. VARIATION GEOGRAPHIQUE ENTRE MILIEU URBAIN ET RURAL DE LA DIVERSITE DES GENES *m*sp-1 ET *m*sp-2 de *Plasmodium falciparum* CHEZ DES ENFANTS DE MOINS DE CINQ ANS¹

I.1. Caractéristiques de l'échantillon

L'amplification génétique par PCR a porté sur 75 et 89 patients, remplissant les critères d'inclusion et vivant respectivement en zone urbaine dans le district sanitaire de Pissy et en zone rurale dans le village de Balonghin, district sanitaire de Saponé.

L'âge moyen des patients était comparable dans les deux sites de l'étude ($p= 0,3$): soit 2,6 ans, Intervalle de Confiance 95% [2,3-2,9] et 2,4 [1,4-3,4] ans respectivement en milieu rural et urbain. Le sexe ratio hommes/femmes était de 1,1 et 1,2 respectivement en milieu rural (Balonghin) et en milieu urbain (Pissy).

I.2. Sensibilité et reproductibilité de la technique d'amplification par PCR

Tous les 164 échantillons (75 et 89) déclarés positifs à la goutte épaisse par la mise en évidence des formes asexuées de *P. falciparum* ont été analysés par la polymérase chain reaction (PCR). L'amplification était un succès pour *m*sp-1 et *m*sp-2 pour tous les échantillons de Pissy. Par contre, 87 soit 97,8% et 73 soit 82,0% des échantillons provenant du milieu rural (Balonghin) étaient positifs à la PCR respectivement pour *m*sp-1, *m*sp-2. En outre, certains échantillons ont été choisis au hasard et testés pour vérifier la reproductibilité de notre technique. Ces échantillons ont servi de témoins positifs pour la suite du génotypage.

¹ Une partie de ce chapitre a fait l'objet d'une publication sous la référence: Soulama I, Nébié I, Ouédraogo A, Gansane A, Diarra A, Tiono AB, Bougouma EC, Konaté AT, Kabré GB, Taylor WR, Sirima SB. *Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso. *Malar J* 2009, 8:135

I.3. Complexité des infections multiples

Le nombre de génotypes parasites présents chez les enfants de l'étude était variable de 1 à 7 en milieu rural contre 1 à 6 en milieu urbain. La complexité de l'infection n'a pas montré de différence statistiquement significative entre les deux milieux (figure 12) ($p=0,1$). Par contre, il a été observé une augmentation significative de la complexité en fonction de l'âge en milieu rural ($p=0,04$, t-test), alors qu'en milieu urbain cette augmentation n'était pas statistiquement significative en ($p=0,06$, t-test) (Figure 12).

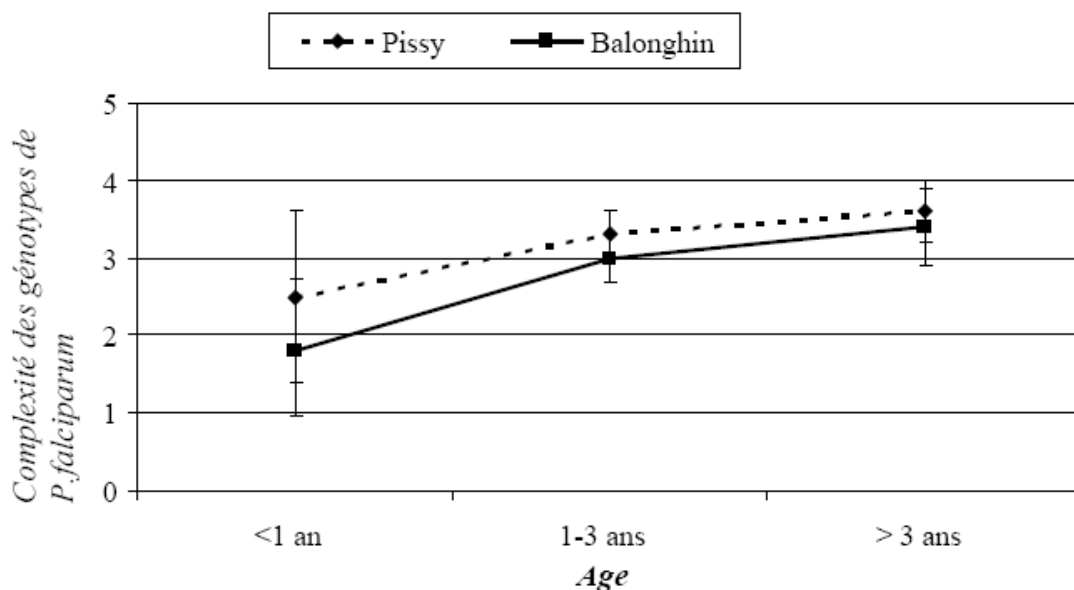


Figure 12: Nombre moyen (complexité) des génotypes de *Plasmodium falciparum* génotypes chez les enfants vivant à Balonghin (milieu rural) et à Pissy (milieu urbain). p - (test de student en milieu rural) =0,04; p - (test de student en milieu urbain)= 0,06

I.4. Prévalence des allèles des gènes *msh-1* et *msh-2*

D'une manière générale, aussi bien en milieu rural qu'en milieu urbain, les allèles K1 étaient les plus représentés chez les enfants symptomatiques (Tableau IV). Il n'y avait aucune différence dans les fréquences des familles alléliques K1 et RO33 entre milieu

rural et milieu urbain alors que significativement plus d'allèles de type Mad20 étaient observés en milieu urbain ($p=0,001$).

En analysant les familles alléliques du gène *m_{sp}-2*, il apparaît que les allèles FC27 étaient plus fréquents chez les enfants symptomatiques en milieu rural qu'en milieu urbain. En plus, leur fréquence en milieu rural était plus élevée que celle des allèles 3D7. Inversement, la fréquence des allèles 3D7 était plus élevée que celle des allèles FC27 en milieu urbain. Cependant, en comparant la fréquence des allèles 3D7 entre milieu urbain et milieu rural, nous n'avons noté aucune différence significative.

Tableau IV: Fréquence d'enfants porteurs des allèles des gènes *m_{sp}-1* et *m_{sp}-2* selon le milieu

Famille Allelique	Milieu Urbain (Pissy)			Milieu Rural (Balonghin)			P
	n	%	(IC 95 %)	n	%	(IC 95 %)	
<i>M_{sp}1</i>							
K1	70	93,3	(87,4-99,1)	83	95,4	(90,9-99,9)	0,8
RO33	54	72,0	(60,0-83,9)	69	79,3	(69,7-88,9)	0,3
Mad20	64	85,3	(76,6-94,0)	55	63,2	(50,5-75,9)	0,001
P	0,002			0,000001			
<i>p</i> (K1vs RO33)	0,0006			0,0003			
<i>p</i> (K1 vs MAD20)	0,11			<<0,00001			
<i>p</i> (RO33vs MAD20)	0,05			0,02			
<i>M_{sp}2</i>							
FC27	41	54,7	(36,5-69,9)	63	86,3	(77,8-94,8)	0,00003
3D7	61	81,3	(71,5-91,1)	50	68,5	(55,6- 81,4)	0,07
P	0,0005			0,01			

I.5.Distribution des allèles individuels *m_{sp}-1* et *m_{sp}-2*

Tous les allèles identifiés ont été classés selon leur taille en paire de base. Au total, 70 allèles individuels ont été identifiés dans les deux gènes et dans les deux sites (Figures 13

et 14): 16 allèles pour FC27 (150-900 pb); 13 pour 3D7 (150-800 pb); 13 pour K1 (100-500 pb); 11 pour RO33 (120-550 pb) et 17 pour Mad20 (100-600 pb).

En milieu urbain, les allèles FC27 étaient rangés entre 280 et 900 pb alors qu'en milieu rural, Très peu d'enfants avaient des allèles FC27 de taille supérieure à 550pb. D'une manière générale, l'allèle de taille 400pb était le plus prédominant chez les enfants aussi bien en milieu rural (40% des allèles FC27) qu'urbain (35%). L'allèle FC27_{350 bp} était statiquement plus représenté chez les enfants en milieu rural qu'en milieu urbain ($p= 0,02$) alors que l'allèle FC27_{450 bp} montrait inversement une fréquence plus élevée en milieu urbain qu'en milieu rural ($p= 0,02$). Nous avons en outre observé que l'allèle 3D7 était le plus infectant aussi bien en milieu rural qu'urbain est l'allèle 3D7_{300 bp} avec 31,6% des cas en milieu urbain et 26% en milieu rural (Figure 13).

L'analyse des allèles K1 du gène *msp1* a permis d'observer quatre allèles les plus dominants (180_{bp}, 200_{bp}, 220_{bp} and 250_{bp}) en milieu rural contre deux en milieu urbain chez les enfants infectés (200 and 220_{bp}). L'allèle K1_{140bp} n'a pas été retrouvé chez les enfants infectés en milieu rural (Figure 14).

Parmi les allèles RO33 du gène *msp1* retrouvés, les allèles RO33_{120 bp} et RO33_{140bp} étaient les plus dominants chez les enfants infectés en milieu rural et urbain avec respectivement 69% et 49%. Nous avons noté la présence de nombreux allèles Mad20 (17 allèles) en milieu urbain comparé au milieu rural (9 allèles) (Figure 14).

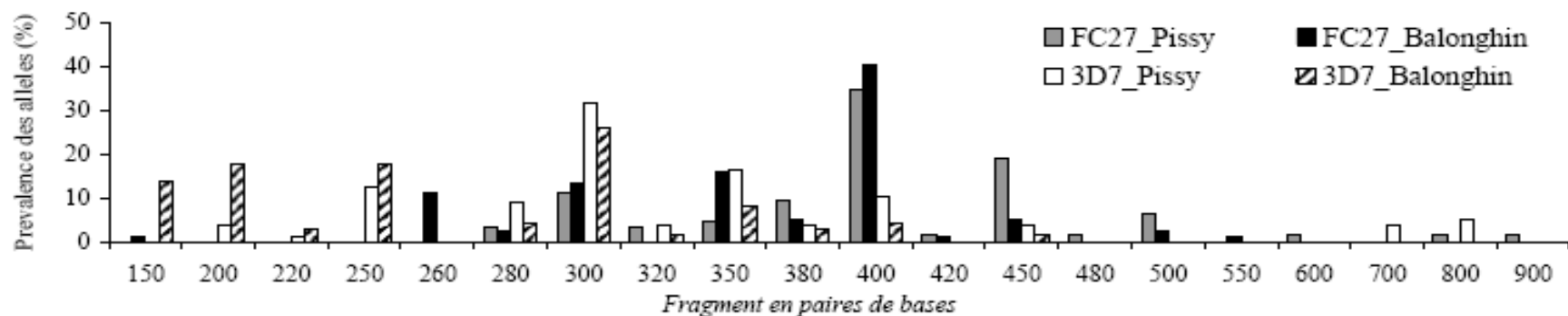


Figure 13: Fréquence des allèles FC27 and 3D7 de *P. falciparum* en fonction de la taille (pairs de base) et du milieu.

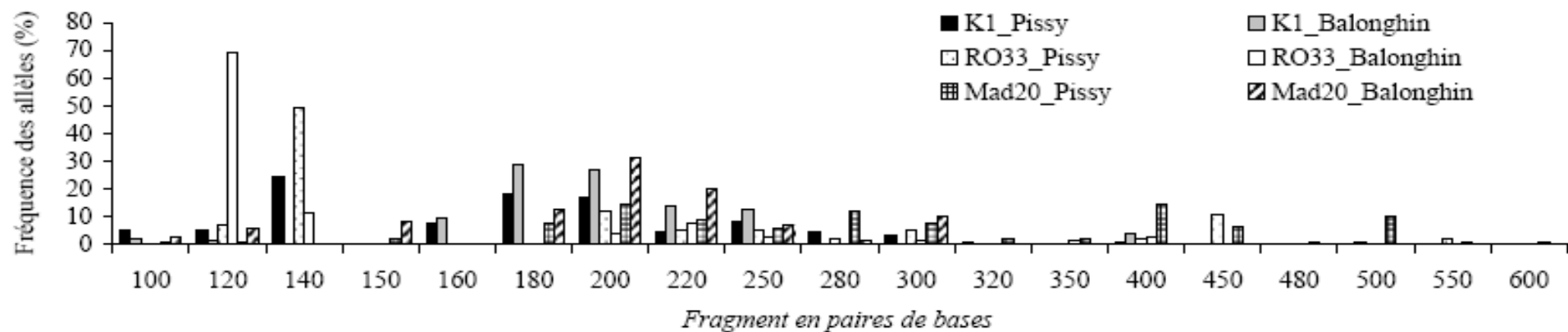


Figure 14: Fréquence des allèles K1, RO33 et Mad 20 de *P. falciparum* en fonction de la taille (pairs de base) et du milieu.

II. VARIATION SAISONNIERE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE *P.FALCIPARUM* BASE SUR LE DIMORPHISM ALLELIQUE DU GENE ERYTHROCYTE BINDING ANTIGEN (EBA)- 175 CHEZ DES ENFANTS DE MOINS DE 5 ANS VIVANT DANS LE DISTRICT SANITAIRE DE SAPONE, BURKINA FASO ²

II.1. Caractéristiques générales de la population d'étude

Au cours de cette étude, des prélèvements sanguins pour gouttes épaisses/frottis sanguin et génotypage du parasite ont été effectués chez des enfants de moins de 5 ans remplissant les critères d'inclusion durant les deux saisons de transmission. Au total 71 sur 336 échantillons (21,1%) durant la saison de faible transmission et 105/334 (31,4%) au cours de la saison de forte transmission analysées à la microscopie ont été déclarées négatives. En appliquant la PCR sur l'ensemble des échantillons négatifs et positifs, 45/336(13.4%) et 95/334 (28.4%) échantillons ont été confirmés négatifs respectivement pendant la saison de faible et de forte transmission.

Finalement, les génotypes *eba-175* ont été analysés sur un total de 530 échantillons confirmés positifs à la PCR : soit 291 et 239 respectivement durant la saison de faible et de forte transmission. L'âge moyen était comparable entre les deux saisons de transmission de l'étude ($p= 0,4$): soit 2,9 ans, Intervalle de Confiance 95% [2,8-3,0] et 3,0 [2,8-3,2] ans respectivement en saison de faible transmission et forte transmission.

Le sexe ratio hommes/femmes était de 1,2 dans la population d'étude et l'âge moyen des participants était estimé à 3,1 [3,1-3,3] ans.

² Une partie de ce chapitre a fait l'objet d'une publication sous la référence:

Soulama I, Bougouma EC, Diarra A, Nebie I, Sirima SB. Low-high season variation in *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175 (*eba-175*) allelic forms in malaria endemic area of Burkina Faso. *Trop Med Int Health*. volume 15 no 1 pp 51–59

II.2. Fréquence de portage des génotypes *eba-175* et densité parasitaire moyenne

Nous avons évalué le portage des génotypes *eba-175* dans la population d'étude en fonction des deux saisons de transmission (Tableau V). Les sujets porteurs de génotypes uniques FCR3 et CAMP représentaient respectivement 56,6% (300/530) et 14,2 % (75/530) de l'ensemble de la population d'étude. Le reste des enfants inclus, 29,2% (155/530) portaient des génotypes mixtes (FCR3 et CAMP). La prévalence des génotypes FCR3 était plus élevée que celle de CAMP quelque soit la saison de transmission ($p=0,0001$ en saison de faible transmission et $p= 0,0001$ en saison de forte transmission). Aussi, La prévalence des infections mixtes (FCR3 plus CAMP) décroît significativement de la saison de faible à la saison de forte transmission ($p= 0,01$).

La moyenne géométrique de la densité parasitaire a été estimée dans la population générale mais aussi en fonction du portage des génotypes FCR3, CAMP ou mixtes. Ainsi bien que légèrement plus élevée chez les sujets porteurs de génotypes parasitaires CAMP, la densité parasitaire n'était pas statistiquement différente entre les différents groupes de portage CAMP, FCR et cas mixtes ($p= 0,7$) (Tableau V).

Tableau V : Fréquence de portage des génotypes *eba-175* dans la population et la moyenne géométrique de la densité parasitaire (*P. falciparum* trophozoites/ μ l).

Types d' infections	Saison de faible transmission (N= 291) N (%)	Saison de forte transmission (N= 239) n (%)	Population Totale N= 530 N (%)	Moyenne Géométrique de la Densité Parasitaire / intervalle de Confiance
Génotypes CAMP	35 (12)	40 (16,7)	75 (14,2)	2404 [1480-4024]
Génotypes FCR3	158 (54,3)	142 (59,4)	300 (56,6)	2346 [1808-2921]
Cas mixtes	98 (33,7)	57 (23,8)	155 (29,2)	2043 [1480-2697]
Total des infections	291 (100)	239 (100)	530 (100)	2257 [1998-2697]
<i>P</i>	< 0,001	< 0,0001	< 0,0001	0,69

II.3. Fréquence des allèles/diversité génétique des génotypes *eba- 175* en fonction des villages de la zone d'étude

La fréquence des allèles et la diversité génétique entre les quatre villages de l'étude ont été évaluées au cours des deux saisons de transmission (Tableau VI).

Les résultats obtenus montrent que les deux villages avec le plus grand nombre d'échantillons, Kounda et Tanghin présentaient les diversités les plus élevées bien que celles-ci n'étaient pas significativement différentes entre les quatre villages ($p=0,07$).

En nous référant au tableau V, il apparaît que les allèles FCR3 présente une fréquence 2 fois supérieure à celle des allèles CAMP dans tous les villages et cela quelque soit la saison de transmission. Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été observée dans la fréquence des allèles FCR3 et CAMP entre les 4 villages de l'étude aussi bien en saison de faible que de forte transmission (Tableau VI)

Tableau VI: Fréquence des allèles et index de diversité moléculaire dans les villages de l'étude durant les saisons de faible et forte transmission.

Fréquence des allèles						χ^2
Faible saison de transmission	Allèles	Dawelgué (n= 61)	Kounda (n= 130)	Tanghin (n= 166)	Watenga (n= 32)	<i>P</i>
	FCR3	0,70	0,66	0,62	0,75	0,42*
	CAMP-	0,30	0,34	0,38	0,25	0,42**
<i>P</i>		<< 0,0001	<< 0,0001	0,00001	<< 0,0001	
Forte saison de transmission	Allèles	Dawelgué (n= 68)	Kounda (n= 112)	Tanghin (n= 98)	Watenga (n= 18)	<i>P</i>
	FCR3-	0,78	0,65	0,61	0,62	0,13 [§]
	CAMP-	0,22	0,35	0,39	0,38	0,13 [£]
<i>P</i>		<< 0,0001	0,0002	0,002	0,008	
Index de Diversité moléculaire						
Nombre de copies de gène		103	192	193	42	p-value
Diversité des gènes		0,4744	0,5834	0,6165	0,4843	0,07 [§]
Déviation Standard de la diversité des gènes		0,0440	0,0250	0,0163	0,0765	

n représente le nombre total d'allèles dans chaque village

*Valeur *p* comparant la fréquence des allèles *F* entre les quatre villages de l'étude Durant la saison de faible transmission; ** Valeur *p* comparant la fréquence des allèles *C* entre les quatre villages de l'étude durant la saison de faible transmission; [§] Valeur *p* comparant la fréquence des allèles *F* entre les quatre villages de l'étude durant la saison de haute transmission; [£] Valeur *p*- comparant la fréquence des allèles *C* entre les quatre villages de l'étude durant la saison de haute transmission; [§] Valeur *p* comparant la diversité génétique entre les villages de l'étude.

II.4. Fréquence des allèles FCR3 et CAMP en fonction de la saison de transmission

Pour faciliter une analyse des données en fonction de la saison et permettre une comparaison de la fréquence des allèles FCR3 et CAMP entre les deux saisons, nous avons regroupé les données des quatre villages en fonction de la saison de transmission. Ainsi la figure 15 présente la comparaison de la fréquence des allèles FCR3 et CAMP en fonction de la saison de faible et de forte transmission. La valeur F_{ST} de la population parasitaire a montré qu'il n'avait pas de différence statistique dans la prévalence des allèles entre les deux saisons de transmission ($F_{ST} = 0,00277$; *p-value* = 0,12, Figure 15)

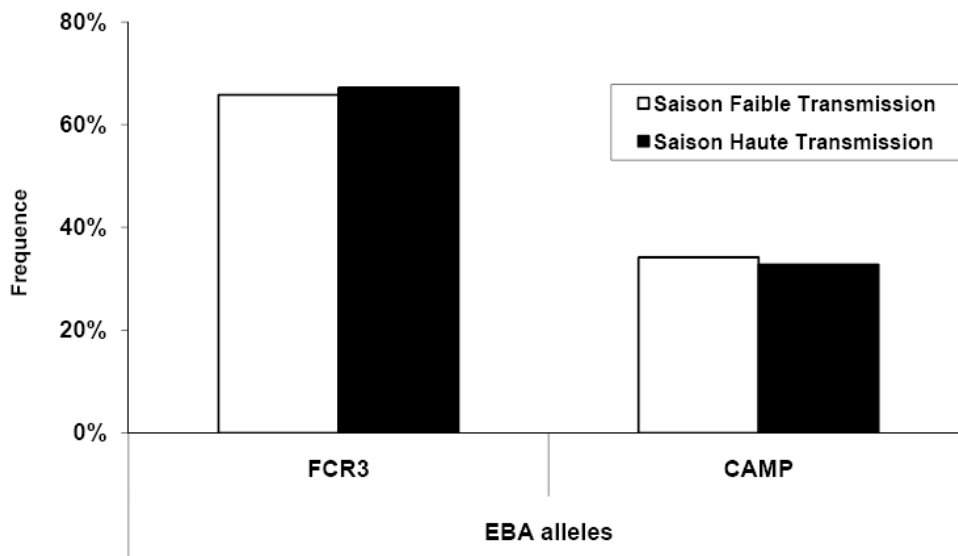


Figure 15 : Distribution temporelle des allèles du gène *eba-175*

$F_{ST} = 0,00277$; $p = 0,12$

II. 5. Différenciation génétique des allèles du gène *eba-175*

En analysant la différenciation génétique entre les 8 populations parasites (4 villages et 2 saisons de transmission) par une comparaison par couple de populations les valeurs F_{ST} selon les règles de Stewall, ont montré une faible Différenciation génétique entre toutes les populations parasites (F_{ST} entre 0 et 0,05) exceptées celles de Dawelgué en saison de forte transmission comparées à celle de Tanghin en saison de faible transmission ($F_{st} = 0,10415$); Dawelgué et Tanghin en saison de forte transmission ($F_{st} = 0,08244$), et Tanghin comparée à Watenga en saison de faible transmission ($F_{st}=0,07414$) où la différenciation génétique était estimée modérée. Aucune différenciation génétique estimée majeure n'a été observée entre les villages et populations parasites dans notre étude, c'est à une valeur $F_{ST} > 0,15$ (Tableau VII).

Tableau VII : Estimation de la Différenciation génétique en fonction de la saison et du village par la valeur F_{ST} .

1(D_L)	2(D_H)	3(K_L)	4(K_H)	5(T_L)	6(T_H)	7(W_L)	8(W_H)

1(D_L) 0,00000							
2(D_H) 0,00938	0,00000						
3(K_L) 0,00180	0,3762	0,00000					
4(K_H) 0,00655	0,04515*	-0,00923	0,00000				
5(T_L) 0,02328	0,10415*	0,01314	0,01716	0,00000			
6(T_H) 0,02925	0,08244*	-0,00069	-0,00643	0,01489	0,00000		
7(W_L) -0,00173	-0,01686	0,00596	0,00733	0,07414*	0,03371	0,00000	
8(W_H) -0,04672	-0,02920	-0,02406	-0,01657	0,01454	0,00859	-0,03973	0,00000

Niveau de significativité $p = 0,05$; * Test Significatif $p \leq 0,05$; $p(D_H/K_H) = 0,018$; $p(D_H/T_L) = 0,009$; $p(D_H/T_H) < 0,00001$; $p(T_L/W_L) = 0,009$
D_L (Dawelgué Saison de faible transmission); *D_H* (Dawelgué Saison de forte transmission); *K_L* (Kounda Saison de faible transmission); *K_H* (Kounda Saison De forte transmission); *T_L* (Tanghin Saison de faible transmission); *T_H* (Tanghin Saison de forte transmission); *W_L* (Watenga Saison de faible transmission); *W_H* (Watenga Saison de forte transmission)

II. 6. Estimation de la variance dans la distribution des allèles du gène *eba-175*

En évaluant la contribution de la saison de transmission, des villages et de la population parasitaire dans la diversité des allèles du gène *eba-175*, l'analyse de la Variance Moléculaire (AMOVA) a montré que la grande proportion de la variance (98,2%) des données est concentrée à l'intérieur des populations individuelles, ou dans la combinaison villages-saisons (Tableau VIII). En outre, les résultats de l'étude ont montré qu'en se référant aux variations à l'intérieur des saisons de transmission, les villages comptent pour une faible mais significative proportion dans la variance (2,22% ; $p = 0,04$). Par contre, la saison de transmission n'apparaît pas contribué significativement ($p = 0,6$) dans la variance totale (Tableau VIII).

Tableau VIII: Estimation des Variances

<i>Niveau hiérarchique</i>	<i>Variance</i>	<i>% total variation</i>	<i>Valeur- p</i>	<i>φ-statistique*</i>
<i>Saison de transmission</i>	-0,0015	-0,41	0,601	$\phi_{CT}^{**} = -0,00408$
<i>Village / A l'intérieur des Saisons de transmission</i>	0,00808	2,22	0,042	$\phi_{SC}^{\$} = 0,02211$
<i>A l'intérieur des populations</i>	0,36166	98,18	0,0108	$\phi_{ST}^{\text{£}} = 0,01812$

* ϕ -statistique (Moyenne *F*-statistique Indices); ** ϕ_{CT} , *F*- indices statistiques par permutation des populations au niveau des saisons de transmission. $\phi_{SC}^{\$}$, *F*-indices statistiques par permutations des haplotypes au niveau des villages à l'intérieur des saisons de transmission; $\phi_{ST}^{\text{£}}$, *F*-Indices statistiques par permutations des haplotypes à l'intérieur des villages à l'intérieur des saisons de transmission).

III. DIVERSITE GENETIQUE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* ET PROFIL CLINIQUE DU PALUDISME CHEZ DES ENFANTS DE 0 A 5 ANS VIVANT DANS LA PROVINCE DU BOULGOU ³

III.1. Répartition des patients en fonction des entités cliniques

Durant la période de l'étude (septembre à novembre 2003), nous avons recruté 405 enfants de 0 à 5 ans repartis en fonction des entités cliniques comme l'indique la figure

16

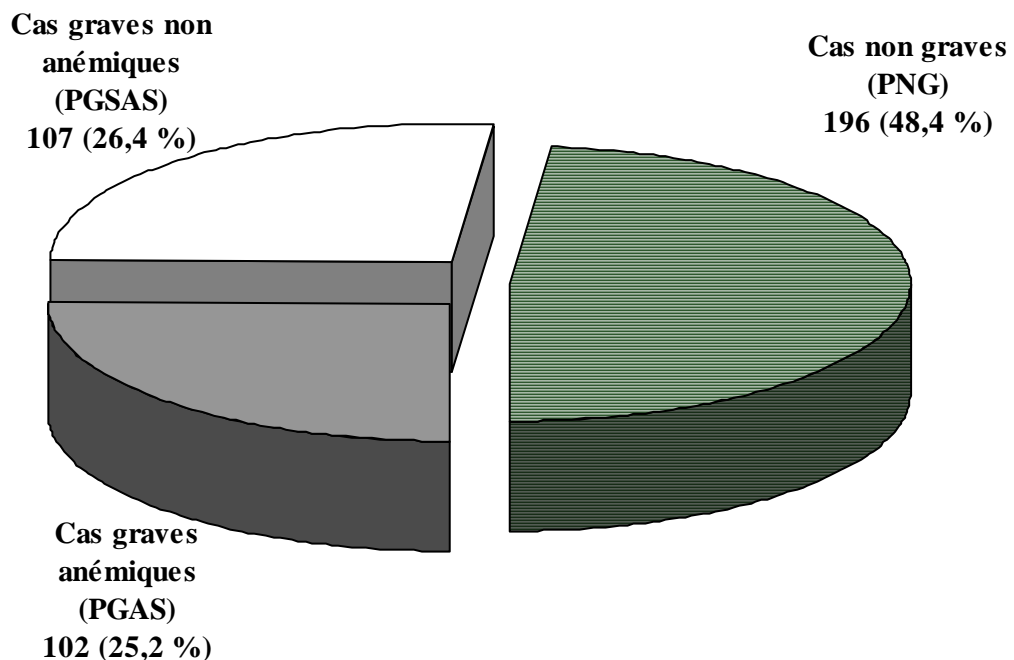


Figure 16 : Répartition des effectifs en fonction des entités cliniques

Nous avons recruté sensiblement un nombre égal de cas graves (209) et de cas non graves (196). Les caractéristiques socio-démographiques, épidémiologiques, cliniques et biologiques de ces patients ont été analysées dans notre étude.

³ Une partie de ce chapitre a fait l'objet d'une publication sous la référence:

Soulama I, Sawadogo M, Nebie I, Diarra A, Tiono AB, Konate A, Sirima SB. Diversité génétique de *Plasmodium falciparum* et pathogénie de l'anémie palustre sévère chez les enfants de moins de 5 ans de la province du Boulgou, Burkina Faso. *Bull Soc Pathol Exot* 2006 Jul, 99:166-70

III.2. Caractéristiques socio-démographiques.

III.2.1. Proportion des patients selon l'âge et les entités cliniques

Nous avons reparti les patients des différentes entités cliniques de l'étude par tranche d'âge (en années) comme représenté dans la figure 17.

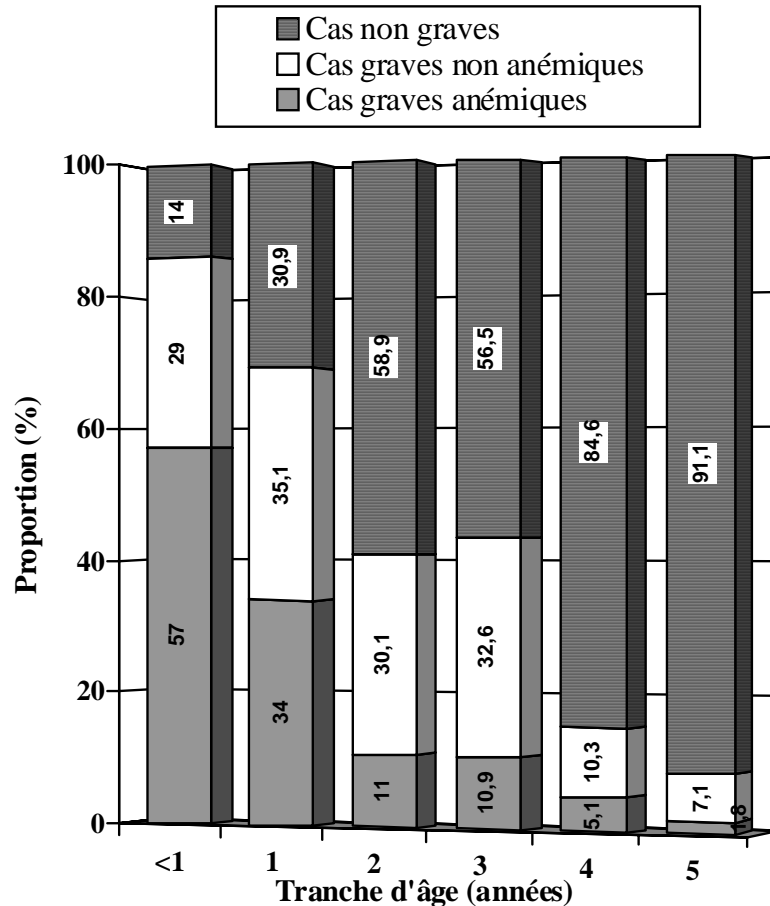


Figure17 : proportion des patients selon l'âge et les entités cliniques.

Les cas graves d'une manière générale étaient plus nombreux dans les tranches d'âge < 1 et 1an. Au-delà de 1 an, le nombre de cas grave décroissait avec l'âge. A l'inverse, la fréquence des cas non graves augmentait avec l'âge, avec un maximum à l'âge de 5 ans. L'âge moyen (\pm écart-type) était de 1,3 (\pm 0,9) ans chez les cas graves anémiques ; 1,9 (\pm 1,2) ans chez les cas graves non anémiques et 3,0 (\pm 1,6) ans chez les cas non graves (figure 17).

La différence est statistiquement significative entre cas graves anémiques et cas graves non anémiques ($\chi^2 = 23,4$ $p = 0,0007$), entre cas graves anémiques et cas non graves ($\chi^2 = 74,6$ $p < 10^{-6}$) et entre cas graves non anémiques et cas non graves ($\chi^2 = 27,5$ $p < 10^{-6}$).

L'âge moyen des cas graves d'une manière générale était de 1,6 ($\pm 0,5$) ans.

III.2.2. Répartition en fonction du genre

Dans l'échantillon global le genre masculin représentait 53,4% et le genre féminin 46,6%. Nous avons noté 51,5 % de sujets de genre masculin chez les cas graves anémiques, 51,9% chez les cas graves non anémiques et 55,1% chez les cas non graves.

La différence de sexe n'est pas statistiquement significative dans les trois entités cliniques. ($\chi^2 = 0,5$ $p = 0,8$).

III.3. Les paramètres biologiques

III.3.1. La densité parasitaire

La densité parasitaire moyenne (moyenne géométrique) chez les cas graves anémiques était de 12.794 ± 7 parasites/ μl avec des extrêmes de 32 et 251.189/ μl ; celle des cas graves non anémiques était de 11.508 ± 6 parasite/ μl avec des extrêmes de 100 et 158.489/ μl . Chez les cas non graves elle était de 2.325 ± 5 parasites/ μl avec des extrêmes de 5 et 9.792 / μl .

III.3.2. Le taux d'hémoglobine

Le taux moyen d'hémoglobine chez les cas graves anémiques était de $3,4 \pm 1,0$ g/dl ; celui des cas graves non anémiques $7,2 \pm 1,6$ g/dl. Chez les cas non graves le taux d'hémoglobine était de $9,2 \pm 1,8$ g/dl. La différence n'était pas significative entre cas graves non anémiques et cas non graves ($p = 0,23$).

III.4. Fréquence des formes alléliques 3D7 et FC27 de *P.falciparum*

III.4.1. En fonction des entités cliniques

D'une manière générale, les fréquences des familles alléliques 3D7 et FC27 des souches parasitaires, respectivement de 77,8% (IC à 95%: 73,8-81,9) 88,2 % (IC : 85,1-91,3) montre une différence statistiquement significative ($P << 0,001$) chez les patients de l'étude porteurs de *P. falciparum*.

En fonction de la sévérité du paludisme, les fréquences des familles alléliques 3D7 et FC27 de *P. falciparum* étaient sensiblement les mêmes chez les malades de paludisme grave (Paludisme Grave Sans anémie Sévère, PGSAS ; et Paludisme Grave Avec Anémie Sévère, PGAS) que chez les cas de paludisme non grave (PNG) (Tableau IX). En comparant les fréquences de ces deux familles alléliques 3D7 et FC27 chez les PNG et les PGSAS, la différence n'était pas statistiquement significative (Tableau IX). Entre PGAS et PGSAS, une différence statistiquement significative n'a été mise en évidence que sur la fréquence de la famille allélique 3D7 (Tableau IX).

Tableau IX : Fréquence des souches 3D7 et FC27 de *P. falciparum* en fonction des entités cliniques

	Cas graves									Cas non graves		
	PGAS			PGSAS			Total			N	%	IC
n	%	IC	n	%	IC	N	%	IC				
3D7	74	72,5	63,8-81,2	90	84,1	77,2-91,0	164	78,5	72,9-84,1	151	77	71,1-82,9
FC27	91	89,2	83,2-95,2	96	89,7	83,9-95,5	187	89,5	85,3-93,7	170	86,7	82,0-91,5
Total	102			107			209			196		

p 3D7 (Cas graves vs Cas non graves) = 0,7 p 3D7 (PGAS vs Cas non graves) = 0,4

p FC27 (Cas graves vs Cas non graves) = 0,4 p FC27 (PGAS vs Cas non graves) = 0,5

p 3D7 (PGSAS vs Cas non graves) = 0,1 p 3D7 (PGAS vs PGSAS) = 0,04

p FC27 (PGSAS vs Cas non graves) = 0,4 p FC27 (PGAS vs PGSAS) = 0,9

III.4.2. En fonction de l'âge

L'analyse de la fréquence des familles alléliques 3D7 et FC27 en fonction de l'âge dans les trois entités cliniques n'a montré aucune différence (Tableau X).

III.4.3. L'analyse de la complexité des génotypes FC27 et 3D7 du gène *msp2*

En définissant la complexité comme le nombre moyen de génotypes parasitaires présents chez un sujet, on note chez les patients de l'échantillon d'une manière générale que le nombre moyen de génotypes parasitaires chez les PNG, PGAS, et PGSAS était respectivement de 2,4 ($\pm 1,6$); 2,9 ($\pm 1,6$) et 2,9 ($\pm 1,4$).

Tableau X : Fréquence des formes alléliques FC27 et 3D7 en fonction de l'âge

Age	PGAS						PGSAS						PNG					
	3D7			FC27			3D7			FC27			3D7			FC27		
	N	(%)	IC	n	(%)	IC	N	(%)	IC	N	(%)	IC	N	(%)	IC	n	(%)	IC
< 1 an	40	(75,5)	63,9-87,1	46	(86,8)	77,7-95,9	22	(81,5)	67,1-95,9	25	(92,6)	82,9-102,3	10	(76,9)	53,9-99,8	11	(84,6)	65-104,2
1 an	26	(78,8)	64,5-92,5	31	(93,9)	85,7-102	32	(94,1)	86,2-102	30	(88,2)	77,4-99,0	24	(80)	65,7-94,3	27	(90)	79,3-100,7
2-5 ans	8	(50)	25,5-74,5	14	(87,5)	71,3-103,7	36	(80)	68,3-91,7	41	(91,1)	82,4-99,8	117	(76,5)	69,8-83,2	132	(86,3)	80,9-91,8
<i>P</i>		0,08			0,05			0,15			0,9			0,9			0,8	

Tableau XI : Complexité des souches de type FC27 et 3D7

Age (années)	Souches 3D7				Souches FC27				Souches 3D7+ FC27			
	Cas graves	PGAS	PGSAS	PNG	Cas graves	PGAS	PGSAS	PNG	Cas graves	PGAS	PGSAS	PNG
<1 an	1,2	1,1	1,2	1,4	1,8	1,8	1,6	1,1	3,0	3,0	2,8	2,5
1 an	1,3	1	1,5	1,3	1,9	1,9	1,8	1,2	3,2	2,9	3,4	2,5
2- 5 ans	1,1	0,9	1,2	1,2	1,4	1,6	1,4	1,2	2,6	2,6	2,6	2,4
0,5 -5 ans	1,2	1	1,3	1,3	1,7	1,8	1,6	1,2	2,9	2,9	2,9	2,5
<i>Valeur de p</i>	0,2	0,4	0,1	0,7	0,06	0,6	0,3	0,9	0,08	0,7	0,05	0,9
Comparaisons statistiques (valeur de p)												
<i>GSAS vs NG</i>	p = 0,3				p <<0,001				p = 0,002			
<i>GAS vs NG</i>	p = 0,1				p <<0,001				p = 0,02			
<i>GAS vs GSAS</i>	p = 0,04				p < 0,04				p = 0,6			
<i>Cas graves vs Cas non graves</i>	p= 0,5				p<<0,001				p= 0,004			

L'analyse de la complexité individuelle des familles alléliques du gène *msh-2* a montré que de façon spécifique, ni la complexité au sein de la famille allélique 3D7 ni au niveau de la famille FC27 ne variait avec l'âge et cela quelle que soit l'entité clinique considérée (Tableau XI). Cependant, en combinant les complexités (génotypes 3D7+FC27), un nombre maximal de génotypes parasitaires est observé chez les cas de PGSAS âgés d'un an (Tableau XI).

Selon la sévérité du paludisme, la complexité des génotypes FC27 était statistiquement plus élevée chez les cas de paludisme grave, qu'ils soient avec ou sans une anémie sévère, comparés aux cas de paludisme non grave (Tableau XI). Dans le groupe des patients avec paludisme grave, la complexité des génotypes 3D7 était significativement plus élevée chez les cas de PGSAS comparés aux cas de PGAS ; à l'inverse, la complexité des génotypes FC27 était plus élevée chez les cas de PGAS comparés aux cas de PGSAS.

III.4.4. La polyclonalité de l'infection

La polyclonalité de l'infection définie comme étant la proportion des enfants ayant plus d'un clone de *P. falciparum* est représentée par la figure 18. Ainsi quel que soit le tableau clinique, 79 % (75,6-83,4) des patients de l'échantillon étaient parasités par plus d'un clone de *P. falciparum*.

Selon les entités cliniques, la polyclonalité était de 78,5% (70,5-86,5) chez les PGAS, 85% (78,2-91,8) chez les PGSAS et 77% (71,1-82,9) chez les PNG (figure 21). Il n'y a pas de différence significative entre les différentes polyclonalités ($\chi^2 = 2,8$ p = 0,2).

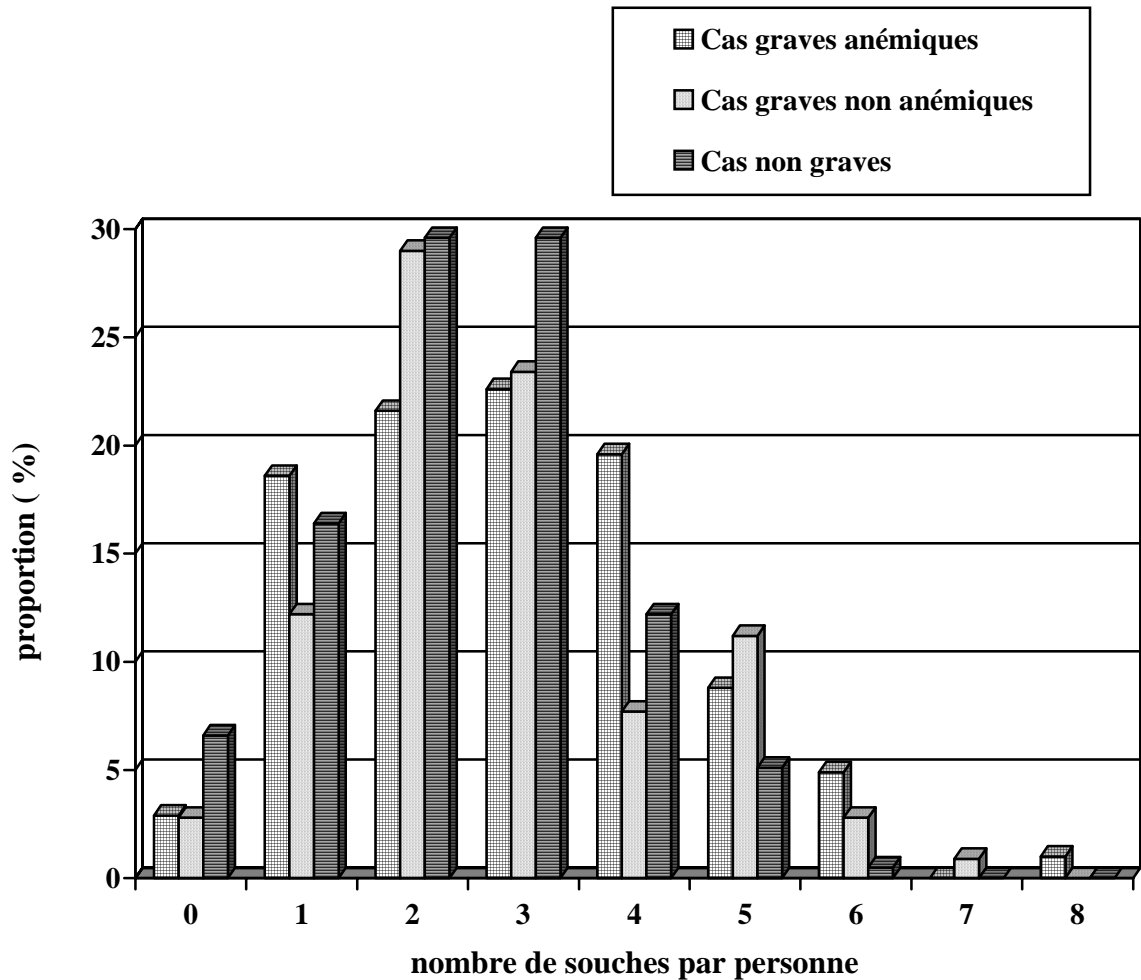


Figure 18 : Proportion du nombre de souches par personne

La figure 18 indique une polyclonalité de 78,5% chez les cas graves anémiques, 85% chez les cas graves non anémiques et 77% chez les cas non graves.

La complexité de l'infection palustre, l'influence de l'environnement sur la biologie du parasite et du vecteur rendent assez difficile non seulement le contrôle de la maladie mais aussi la généralisation des résultats, d'où la nécessité d'une meilleure connaissance à la fois locale et régionale de la diversité génétique du parasite et du vecteur.

CHAPITRE IV : DISCUSSION

Au cours de cette thèse pour caractériser la diversité génétique, nous avons étudié trois différents gènes, *msh-1*, *msh-2* et *eba-175* qui codent tous pour des antigènes de surface, assumant différentes fonctions spécifiques dans le cycle de développement du parasite. Le choix de ces gènes se justifie par la volonté d'associer des gènes extrêmement polymorphiques (*msh-1* et *msh-2*) à des gènes de polymorphisme modéré (*eba-175* est un gène dimorphique) dans l'objectif de ne pas trop biaiser l'étude uniquement par des gènes extrêmement polymorphiques dont les antigènes pour lesquels ils codent sont soumis à une forte pression immunitaire sélective.

En outre, dans le but d'élargir nos connaissances et compétences dans le domaine de la biologie moléculaire, nous avons expérimenté différentes techniques d'extraction de l'ADN parasitaire déjà décrites dans la littérature (extraction par la technique au CTAB/DTAB, extraction au Chelex, extraction par les kits Qiagen). L'application de ces différentes méthodes d'extraction nous a permis d'apprécier le rendement d'extraction beaucoup plus important avec le kit Qiagen et le Chelex comparés à la technique CTAB/DTAB, cette dernière présentant d'ailleurs un risque de toxicité du manipulateur lié à l'utilisation du chloroforme.

Enfin les enfants de 0 à 5 ans, population la plus vulnérable au paludisme ont constitué les cibles de nos différentes études. Cela pourrait constituer une limite à notre étude car ne permettant pas une appréciation de la diversité parasitaire au niveau des adultes. Cependant, ce choix exprès est lié à la grande susceptibilité de cette tranche d'âge faisant l'objet d'une attention particulière au niveau même de l'organisation mondiale de la santé. D'où l'importance et le choix de cette tranche d'âge tout en soulignant la nécessité d'avoir des données chez les adultes pour compléter le tableau de la diversité parasitaire génétique de *P.falciparum*.

DE LA VARIATION GEOGRAPHIQUE ENTRE MILIEU URBAIN ET RURAL DE LA DIVERSITE DES GENES *m*sp-1 ET *m*sp-2 DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* CHEZ DE ENFANTS DE MOINS DE CINQ ANS

Le but de cette étude était de comparer la diversité génétique de *P. falciparum* chez des enfants symptomatiques vivant dans deux zones différentes, rurale et urbaine caractérisées par des niveaux de transmission différents. Aussi, pour répondre à cette question scientifique, nous avons choisi d'analyser des gènes dont les régions polymorphiques ont montré dans différentes études antérieures (Felger *et al.*, 1994; Haddad *et al.*, 1999; Aubouy *et al.*, 2003) un très haut degré de polymorphisme, à savoir *m*sp-1 et *m*sp-2.

D'une manière générale, les résultats de notre étude (Tableau III) ont montré que les allèles appartenant aux trois familles K1, Mad20 et RO33 du gène *m*sp-1 étaient qualitativement présents aussi bien en milieu urbain que rural chez les enfants symptomatiques. Cependant, la distribution semble être quantitativement différente en fonction du milieu. Ainsi, il a noté une prédominance d'enfants porteurs des allèles K1 du gène *m*sp-1 comparés aux allèles RO33 et Mad20 aussi bien en milieu rural ($p < 0,001$) qu'en milieu urbain ($p = 0,002$).

Cette architecture de la distribution des allèles K1 du gène *m*sp-1 est soutenue par des études antérieures réalisées au Gabon en Afrique centrale (Missinou *et al.*, 2001; Aubouy *et al.*, 2003) et même au Honduras en Amérique (Haddad *et al.*, 1999). D'autre part, les enfants porteurs d'allèles Mad20 étaient statistiquement plus nombreux en milieu urbain qu'en milieu rural ($p = 0,001$).

En outre en analysant de façon plus détaillée la fréquence des allèles individuels, nous avons noté une fréquence élevée des allèles K1_{140bp} et RO33_{140pb} chez les enfants en milieu urbain comparée à une fréquence élevée de l'allèle RO33_{120pb} chez les enfants

vivant en milieu rural. Ces différences entre les enfants symptomatiques en milieu rural et urbain pourraient s'expliquer par une réponse immunitaire spécifique contre des allèles ou simplement du à une sélection naturelle randomisée des allèles lors d'échange génétique (Bogreau *et al.*,2006).

L'analyse des familles alléliques du gène *msh-2* a montré une prédominance de sujets porteurs des allèles FC27 en milieu rural alors qu'en milieu urbain la plupart des enfants étaient infectés par des allèles 3D7. En analysant individuellement les allèles FC27, l'allèle FC27_{350pb} avait la plus grande prévalence chez les enfants vivant en milieu rural comparé à l'allèle FC27_{450pb} principalement observé chez les enfants en milieu urbain. La différence entre les niveaux de transmission et l'immunité antipalustre observée spécifique aux génotypes parasitaires pourrait en partie expliquer la distribution des allèles (Magesa *et al.*,2002).

Il ressort de l'analyse du Ministère de l'habitat en 2008, (DEP Ministère Habitat, 2008) que le processus de migration entre le milieu rural à la ville de Ouagadougou a beaucoup progressé ces dix dernières années. Ces changements démographiques, en milieu urbain aussi bien que d'autres facteurs tels ceux individuels ou des ménages (exemple: utilisation de matériaux imprégnés, insecticides,..) et climatiques et topographiques, tels que l'humidité, la pluviométrie, les lacs, les barrages d'eaux, peuvent affecter le niveau de transmission et conduire à une différence dans la distribution et le portage des génotypes parasitaires entre le milieu urbain et rural.

Aussi, dans un milieu donné, la diversité des parasites peut être relativement stable avec une distribution aléatoire de sorte que certains allèles peuvent être prédominants. Néanmoins, certains facteurs externes au cycle de vie naturel des parasites sont connus pour leur effet sur la distribution allélique, notamment la pression des médicaments antipaludiques plus élevée en milieu urbain entraînant une forte prévalence

des marqueurs de résistance comparée au milieu rural (Meissner *et al.*, 2008), la présence des populations à proximité des cours d'eau ou des barrages comme cela est le cas du district sanitaire de Pissy (Nebie, 2002), l'utilisation d'insecticides ou la présence de certains facteurs génétiques humains (types d'hémoglobine, Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase), qui pourraient aussi expliquer la différence de la distribution des génotypes de *P. falciparum* entre milieux urbain et rural.

Les résultats de cette étude n'ont pas montré de différence significative au niveau de la complexité des infections entre le milieu rural et le milieu urbain, respectivement $3,0 \pm 1,3$ et $3,3 \pm 1,1$ génotypes. La complexité observée en milieu rural de Balonghin était comparable à celle obtenue dans une étude que nous avons menée à Tenkodogo. En outre, les résultats ont montré que la complexité de l'infection augmentait avec l'âge dans les deux sites. Cette augmentation était significative en milieu rural et à la limite de la significativité en milieu urbain. Ce qui suggère que les plus jeunes enfants resteraient toujours sous la protection des anticorps maternels. Cette augmentation de la complexité avec l'âge corrobore avec les résultats d'études antérieures que nous avons obtenu à Tenkodogo bien que Issifou *et al.*, 2001 n'ont pas observée une telle relation avec l'âge au Bénin. D'autres facteurs, tels que l'intensité de transmission ou la saison de transmission pourraient également affecter la variation de la complexité de l'infection (Ntoumi *et al.*, 1995; Roper *et al.* 1998; Beck *et al.*, 1999).

DE LA VARIATION SAISONNIERE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* BASEE SUR LE DIMORPHISME ALLELIQUE DU GENE ERYTHROCYTE BINDING ANTIGEN (*EBA*)- 175 CHEZ DES ENFANTS DE MOINS DE 5 ANS VIVANT DANS LE DISTRICT SANITAIRE DE SAPONE, BURKINA FASO

La protéine Erythrocyte Binding Antigen-175, comme le montrent la littérature a fait l'objet de nombreuses études antérieures (Toure *et al.*, 2001; Cramer *et al.*, 2004; Toure 2006), particulièrement dans les pays endémiques du paludisme. Cet antigène est considéré aujourd'hui comme l'un des candidats vaccins prometteurs en expérimentation dans le pipeline de la recherche d'un vaccin antipaludique efficace. En effet, la position centrale de la protéine *eba-175* dans le processus d'invasion de l'érythrocyte justifie pleinement la nécessité d'une meilleure compréhension du polymorphisme génétique du gène codant pour cette protéine (Camus et Hadley 1985; Klotz *et al.*, 1992; Sim *et al.*, 1994). Aussi, la présente étude a été conçue pour évaluer la variation saisonnière de la fréquence des allèles du gène *erythrocyte binding antigène-175* chez des enfants de moins de cinq ans présentant un paludisme simple et vivant dans quatre villages endémiques situés dans le district sanitaire de Saponé au centre sud de la capitale Ouagadougou.

La fréquence élevée des allèles FCR3 comparée à celle des allèles CAMP observée dans notre étude aussi bien en saison de faible transmission qu'en saison de forte transmission confirme que la distribution des allèles FCR3 et CAMP est relativement stable pendant 8 mois environ. Cette fréquence élevée des allèles FCR3 est en accord avec les résultats obtenus au Ghana (Cramer *et al.*, 2004) et au Gabon (Toure *et al.*, 2006). Ce qui démontre probablement que l'allèle FCR3 serait prédominant en Afrique de l'Ouest et du Centre. Par contre, en Afrique de l'Est où la transmission du paludisme est faible, des études antérieures ont montré que les allèles CAMP étaient les

plus prédominants comparés aux allèles FCR3 (Binks *et al.*, 2001). Des différences significatives dans la distribution des allèles *eba-175* ont aussi été reportées entre les provinces sud et nord de la République Démocratique du Laos (Dittrich *et al.*, 2003). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette variation géographique des allèles du gène *eba-175* parmi lesquelles une modification soudaine imprévisible (due au hasard) dans la fréquence des allèles pouvant s'expliquer par des mouvements génétiques entre populations génétiquement isolées (Cramer *et al.*, 2004). Ces variations pourraient également s'expliquer par les différences génétiques au niveau des hôtes humains dans les populations de notre site d'étude qui pourraient être des facteurs de sélection des allèles FCR3 ou CAMP du gène *eba-175* (Dittrich *et al.*, 2003).

A notre connaissance, cette étude est une des premières, analysant la variation saisonnière du dimorphisme allélique du gène *eba-175* entre saison de faible et de forte transmission dans une région endémique. Les résultats de notre étude ont montré que la variation de la saison de transmission n'affectait pas la distribution des allèles du gène *eba-175* exception faite de la réduction des infections mixtes constatée pendant la saison de forte transmission comparée à la saison de faible transmission. Cette réduction pourrait s'expliquer par les facilités de prise en charge des cas de paludisme, instaurées dans les formations sanitaires depuis le début de la saison de faible transmission. Aussi l'amélioration de l'accessibilité par la gratuité des soins au niveau des formations sanitaires durant une année de suivi passive aurait augmenté le taux de fréquentation des centres de santé, par conséquent réduirait le nombre d'épisode palustre. En outre, l'utilisation des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine dans la prise en charge des cas simples de paludisme dans les formations sanitaires éliminerait les génotypes sensibles avec une réduction du nombre des infections mixtes chez les enfants infectés.

Par ailleurs les résultats de notre étude n'ont pas montré une différence significative dans la diversité des allèles entre les quatre villages du site d'étude. Aussi, le fait que les villages soient très proches (dans un rayon de 8 kilomètres) pourrait expliquer la similarité dans la diversité des allèles FCR3 et CAMP démontrant par conséquent, au regard de la différenciation faible ou modérée une absence de restriction dans le mouvement des allèles entre les villages. Cependant, comme souligné plus haut, cette similarité dans la diversité des allèles pourrait bien s'expliquer par les origines génétiques de la population d'étude qui pourraient contribuer à une homogénéité dans la distribution des allèles comme cela a été auparavant souligné dans des études antérieures notamment dans la République Démocratique du Laos où des différences significatives ont été observées entre le Nord et le Sud ayant des groupes ethniques différents (Dittrich *et al.* 2003).

Cette apparente stabilité dans la fréquence des allèles *eba-175* dans les villages de notre étude représenterait un atout important pour l'étude de candidats vaccins contenant l'antigène *eba-175*. Cependant, une étude plus élargie dans des régions en Afrique au Sud du Sahara permettait une comparaison géographique indispensable et prenant en compte à la fois les distances géographiques mais aussi les origines génétiques des différentes populations, Cette étude permettait d'appréhender d'avantage les facteurs pouvant affecter la distribution des allèles *eba-175*.

DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE *PLASMODIUM FALCIPARUM* EN FONCTION DU PROFIL CLINIQUE DU PALUDISME CHEZ DES ENFANTS DE 0 A 5 ANS VIVANT DANS LA PROVINCE DU BOULGOU

Cette étude a été entreprise pour analyser le polymorphisme allélique du gène *msp2* de *P. falciparum* chez des enfants atteints de paludisme grave ou de paludisme non grave. En analysant la fréquence des familles alléliques du gène *msp2*, nous n'avons pas

noté de différence dans la fréquence de la famille FC27 entre les trois entités cliniques. Ces résultats corroborent ceux de nombreuses autres études réalisées au Sénégal (Zwetyenga *et al.*, 1998) et au Gabon (Ntoumi *et al.*, 2001). Cependant, nos résultats sont contraires à ceux d'Engelbrecht *et al.*, 1995, qui ont trouvés en Papouasie Nouvelle Guinée, une fréquence plus élevée de la famille FC27 chez des malades que chez des sujets asymptomatiques. Le constat d'une fréquence plus élevée des génotypes FC27 chez les malades a été aussi décrit par Marshall *et al.*, 1994, Felger *et al.*, 1994 et Marshall *et al.*, 1994; alors que Ntoumi *et al.*, 1995, notaient une fréquence élevée de génotypes FC27 plutôt chez des porteurs asymptomatiques dans une région holoendémique de Dakar.

Par ailleurs, l'analyse de nos résultats a révélé que la fréquence des formes parasitaires 3D7 n'était pas différente entre cas graves et cas non graves. Cela confirme les résultats obtenus à Dakar entre les cas de paludisme graves et les cas non graves (Robert *et al.*, 1996). Cette observation diffère des constats faits au Gabon où il a été mis en évidence une fréquence plus élevée de la famille allélique 3D7 dans les infections asymptomatiques que symptomatiques. Cependant, une prédominance des génotypes 3D7 a été notée dans notre étude chez les cas graves sans anémie sévère lorsqu'ils sont comparés aux cas graves avec anémie sévère. Ainsi, il pourrait y avoir une association statistiquement significative entre la présence de la famille allélique 3D7 et l'atténuation de la sévérité de l'anémie palustre.

Nous n'avons pas noté de corrélation significative entre l'âge des patients et la fréquence des familles alléliques FC27 et 3D7 quelle que soit l'entité clinique. D'ailleurs, de nombreuses études (Felger *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999) effectuées notamment en zone endémique ont fait le même constat.

La complexité reflétant au niveau individuel la relation hôte-parasite, nous n'avons pas noté de variation significative avec l'âge en ce qui concerne la complexité des génotypes dans notre étude quel que soit l'état clinique du patient. Un constat similaire a été fait au Bénin (Issifou *et al.*, 2001) et au Ghana (Mockenhaupt *et al.*, 2003) alors que des variations significatives de la complexité des génotypes de *P. falciparum* avec l'âge ont été observées par Ntoumi *et al.*, 1995 qui rapportaient dans une étude réalisée en 1995 au Sénégal que de 4 génotypes de *P. falciparum* en moyenne par individu chez des enfants de 0 à 14 ans, la complexité passait à 2 génotypes chez les sujets âgés. Nous n'avons pas pu observer une telle réduction dans notre étude probablement parce que les enfants de notre étude avaient moins de 5 ans.

Dans notre étude, la complexité des génotypes FC27 est statistiquement plus élevée chez les cas graves d'une manière générale que chez les cas non graves. Le nombre élevé de génotypes de type FC27 semble être donc associé à la gravité du paludisme. Cette conclusion est intéressante à relever car elle vient renforcer celles de Engelbrecht *et al.*, 1995, Felger *et al.*, 1996 et Beck *et al.*, 1999 qui ont indiqué que les génotypes parasitaires de type FC27 sont associées à un risque accru de paludisme grave.

Par contre, le nombre moyen de génotypes 3D7 n'était pas différent entre cas graves et cas non graves, mais nous avons plutôt constaté une complexité des génotypes 3D7 plus élevée chez les cas graves sans anémie sévère comparés aux cas graves avec anémie sévère. Cette dernière observation conforte une fois de plus l'hypothèse selon laquelle les souches 3D7 protègeraient contre la sévérité de l'anémie. Par ailleurs, la valeur de complexité obtenue chez les cas non graves serait proche de celle obtenue par Felger *et al.*, 1999 en Tanzanie.

En analysant la complexité moyenne de l'ensemble des génotypes parasitaires, c'est-à-dire 3D7 et FC27 confondues, nous n'avons pas observé de différence

statistiquement significative entre les entités cliniques de notre étude contrairement à Mockenhaupt *et al.*, 2003 qui ont constaté qu'une complexité élevée contribuerait à la sévérité de l'anémie palustre. Les valeurs de complexité trouvées respectivement chez les cas graves avec anémie sévère et sans anémie sévère sont supérieures aux valeurs obtenues par Robert *et al.*, 1996 au Sénégal, respectivement $2,9 \pm 1,6$ et $2,9 \pm 1,4$ dans notre étude contre 2,4 et 2,3.

Une complexité d'ensemble (3D7+FC27) de 2,4, similaire à la valeur obtenue dans notre étude chez les cas non graves, a été rapportée par Felger *et al.*, 1999. Des valeurs de complexité de 5 et 4,5, plus élevées que les nôtres ont été en outre retrouvées chez des cas non graves, respectivement par Beck *et al.*, 1999 en Tanzanie et Engelbrecht *et al.*, 2000 au Nigéria. Ces différences seraient liées au niveau de transmission plus élevé dans ces zones comparé à notre zone d'étude.

Dans notre étude, le nombre de génotypes de *P. falciparum* varie de 0 à 8 par personne (Figure 11). L'absence de différence dans la fréquence des infections multiples dans notre étude entre les entités cliniques pourrait s'expliquer par le niveau d'endémicité élevé lié à un taux d'inoculation assez élevé. Par ailleurs, il est à noter que 44,2% des cas graves avec anémie sévère, 52,4% des cas graves sans anémie sévère et 59,2% des cas non graves, hébergeaient 2 ou 3 génotypes différents de *P. falciparum*. Ce qui témoigne d'une polyclonalité élevée.

La présence élevée d'infections multiples constatées dans notre étude a été aussi décrite par Smith *et al.*, 1999, qui ont rapporté en Tanzanie jusqu'à 5 génotypes différentes de *P. falciparum* par personne. Engelbrecht *et al.*, 2000 avaient noté au Nord du Nigeria chez des sujets asymptomatiques une polyclonalité d'environ 80% proche des 77% de notre étude. Cette fréquence élevée de génotypes multiples de *P. falciparum* en Afrique sub-saharienne, contraste avec des études effectuées en Papouasie-Nouvelle-

Guinée (PNG) où Felger *et al.*, 1994, Engelbrecht *et al.*, 1995 ont noté seulement un génotype par personne, rarement deux. Cette faible fréquence de génotypes multiples, s'expliquerait par le bas niveau de transmission du paludisme dans cette région (Engelbrecht *et al.*, 2000).

CONCLUSIONS

Les chapitres qui ont constitué cette thèse nous ont permis, dans la réalisation des activités de laboratoire qui y étaient imparties, de nous approprier les techniques et les connaissances indispensables à une meilleure utilisation de l'outil moléculaire d'une part, mais aussi d'autre part d'apporter notre contribution à l'éclairage sur la diversité de *Plasmodium falciparum* en fonction du profil clinique, de la géographie et de la saison de transmission dans notre contexte local.

En effet, cette étude tout en apportant des informations sur la caractérisation de sites démontre au vu des résultats obtenus qu'il y a des différences dans la diversité de *P. falciparum* chez des enfants symptomatiques vivant en milieu urbain et rural aussi bien dans la prévalence de certaines familles alléliques que dans la prévalence des allèles individuels. Ces résultats seraient à prendre en compte dans la recherche et la mise en œuvre d'essais de vaccins antipaludiques utilisant des antigènes MSP1 ou MSP2.

Par ailleurs, en analysant le dimorphisme allélique des allèles du gène *eba-175* de *P. falciparum* entre la saison de faible et de forte transmission du paludisme, tout en démontrant que la variation de la saison de transmission n'affectait pas le dimorphisme allélique, les résultats soulignent la prédominance des allèles FCR3 dans notre zone d'étude. Ces résultats constituent des informations utiles pour la caractérisation de sites dans le cadre de développement d'éventuels sites d'essais vaccinaux. Cependant la nécessité et l'importance d'une étude élargie dans différentes régions du Burkina Faso et en Afrique serait d'un apport considérable.

Enfin, l'étude sur le polymorphisme allélique du gène *msp-2* de *P. falciparum* en fonction du profil a permis de comparer non seulement la fréquence des familles alléliques FC27 et 3D7 mais aussi a montré que la complexité des génotypes FC27 était significativement plus élevée chez les enfants présentant un paludisme grave d'une manière générale que dans les cas de paludisme non grave.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont la conséquence d'une utilisation rigoureuse des protocoles et techniques de travail établis. Cependant, il est important de rester continuellement informés au regard de l'évolution actuelle de nouvelles technologies. En effet, les méthodes de séquençage et des microsattellites, bien que coûteuses, offrent aujourd'hui d'énormes possibilités pour affiner les résultats de génotypage. Ces nouveaux outils constituent pour nous d'autres opportunités d'apprendre d'avantage en vue de répondre favorablement aux exigences scientifiques du moment.

Enfin, nous restons convaincus que les formations reçues et les techniques apprises au cours de cette thèse nous permettront de contribuer efficacement aux efforts de recherche d'un vaccin antipaludique efficace au profit des enfants vivant au Sud du Sahara.

PERSPECTIVES

Nos perspectives seraient de :

- ▶ Constituer une banque de données sur la diversité génétique du parasite du paludisme en poursuivant dans la limite des moyens disponibles la cartographie aussi bien des gènes de polymorphisme que des gènes de résistance au Burkina Faso et en collaboration avec d'autres institutions sous régionales.
- ▶ Contribuer de façon efficace à la surveillance de la résistance du parasite aux antipaludiques par l'outil moléculaire
- ▶ Intégrer de nouveaux outils moléculaires comme le séquençage ou d'autres marqueurs génétiques comme les microsatellites, ce qui pourrait apporter plus de précision dans les méthodes utilisées.

***REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES***

- Abu Bakar S, 1997. " Immunological and function properties of non-repeat region in *Plasmodium falciparum* antigen." Thèse, Stockholm: 41p.
- Adams J., Blair PL., Kaneko O et Peterson DS, 2001. "An expanding *eb1* family of *Plasmodium falciparum*." Trends Parasitol. **17**: 297-299.
- Alonso PL., Sacarlal J., Aponte JJ., Leach A., Macete E., Milman J., Mandomando I., Spiessens B., Guinovart C., Espasa M., Bassat Q., Aide P., Ofori-Anyinam O., Navia MM., Corachan S., Ceuppens M., Dubois MC., Demoitié MA., Dubovsky F., Menéndez C., Tornieporth N., Ballou WR., Thompson R et Cohen J, 2004. "Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial." Lancet **364(9443)**: 1411-20.
- Aravind L., Iyer LM, Wellems TE et Miller LH, 2003. "Plasmodium biology: genomic gleanings." Cell **115**(771-785).
- Aubouy A., Bakary M., Keundjian A., Mbomat B., Makita JR., Migot-Nabias F. Cot M., LE Bras J et DELORON P, 2003. "Combination of drug level measurement and parasite genotyping data for improved assessment of amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine efficacies in treating *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children." Antimicrob Agents Chemother **47**(1): 231-7.
- Babiker H., Lines J., Hill WG et Walliker D, 1997. " Population structure of *Plasmodium falciparum* in village with different malaria endemicity in east Africa." Am J Trop Med Hyg **56**: 141-147.
- Baird J., Owusu AS., Utz GC., Koram K., Barcus MJ., Jones TR., Fryauff DJ., Binka FN., Hoffman SL et Nkrumah FN, 2002. "Seasonal malaria attack rates in infants and young children in northern Ghana." American Journal of Tropical Medicine and Hygiene **Vol 66**, (Issue 3): 280-286.

- Bannister L. et Mitchell GH, 1995. "The role of the cytoskeleton in *Plasmodium falciparum* merozoite biology: an electron microscopic view." Annals of Tropical Medicine and Parasitology **89**: 105-111.
- Bannister L. et Mitchell G, 2003. "The ins, outs and roundabouts of malaria." Trends Parasitol **19**: 209-213.
- Barry A, 2005. "Malaria epidemiology: Insights from the genome of the malaria parasite." Journal of Molecular and Genetic Medicine **1(2)**: 76-86.
- Beck H-P., Felger I., Vounatsou P., Hirt R., Tanner M., Alonso P et Menendez C, 1999. "Effect of iron supplementation and malaria prophylaxis in infants on *P. falciparum* genotype and multiplicity of the infection." Trans R Soc Trop Med Hyg **93, suppl 1**: 41- 45.
- Biamba G., Dolmans D., Thuma PE., Weiss G et Victor RG, 2000. "Severe anemia in Zambien children." Tropical Medicine and International Health **5 (1)**: 9-16.
- Binks RH., Baum J., Oduola AM., Arnot DE., Babiker HA., Kremsner PG., Roper C., Greenwood BM et Conway DJ, 2001. "Population genetic analysis of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene." Mol Biochem Parasitol **114(1)**: 63-70.
- Bischoff E, 2001. "Etude de deux membres de la superfamille multigenique Pf60/var de *Plasmodium falciparum*, exprimes par Recodage traductionnel programme, Universite Paris 7." Thèse de Doctorat: 172.
- Bogreau, H., Renaud F., Bouchiba H., Durand P., Assi SB., Henry M C., Garnotel E., Pradines B., Fusai T., Wade B., Adehissi E., Parola P., Kamil MA., O. Puijalon, et Rogier C. "Genetic diversity and structure of african *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas." Am. J. Trop. Med. Hyg **74 (6)**: 953-959.

- Bowman S., Lawson D., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Churcher CM., Craig A., Davies RM., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Gwilliam R., Hamlin N., Harris D., Holroyd S., Hornsby T., Horrocks P., Jagels K., Jassal B., Kyes S., McLean J., Moule S., Mungall K., Murphy L., Oliver K., Quail MA., Rajandream MA., Rutter S., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston JE., Whitehead S., Woodward JR., Newbold C et Barrell BG, 1999. "The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of *Plasmodium falciparum*." Nature **400**: 532.
- Camus D et Hadley TJ, 1985. "A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites." Science **230**: 553-556.
- Cattamanchi A., Kyabayinze D., Hubbard A., Rosenthal PJ., Dorsey G, 2003. "Distinguishing recrudescence from reinfection in a longitudinal antimalarial drug efficacy study: comparison of results based on genotyping of msp-1, msp-2, and glurp." Am J Trop Med Hyg **68**(2): 133-9.
- Chitnis C. et Blackman MJ, 2000. "Host cell invasion by malaria parasites." Parasitol Today **16**: 411-415.
- Clyde D., Most H., McCarthy VC et Vanderberg JP, 1973. "Immunization of man against sporozite-induced *Plasmodium falciparum* malaria." Am. J. Med. Sci **266**: 169-77.
- Contamin H., Bonnefoy T., Skouri S., Ntoumi F et Mercereau-Puijalon FO, 1995. "PCR typing of field isolates of *Plasmodium falciparum*." J Clin Microbiol **33**(4): 944-51.
- Costantini C., Sagnon N'F., Ilboudo-Sanogo E., Coluzzi M. et Boccolini D, 1999. "Chromosomal and heterogeneities suggest incipient speciation in *Anopheles funestus* from Burkina Faso." Parasitologia **41**: 595-611.

- Cramer Jakob P., Mockenhaupt Frank P., Möhl I., Dittrich S., Dietz E., Rowland N O., Ehrhardt S., Bienzle U et Tomas Jelinek" Allelic dimorphism of the erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene of *Plasmodium falciparum* and severe malaria: Significant association of the C-segment with fatal outcome in Ghanaian children." Malar J **3**: 11.
- Deitsch KW., Moxon ER et Wellems TE, 1997. "Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections." Microbiology and molecular Biology Reviews **61**: 281-293.
- Desowitz RS, 1991. "The malaria capers. In More Tales of Parasites and People, Research and Reality." ed. W.W.N. Company, New York.
- Dittrich S., Schwobel B., Jordan S., Vanisaveth V., Rattanaxay P., Christophel EM., Phompida S et Jelinek T, 2003. "Distribution of the two forms of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene in Lao PDR." Malar J: **2**:23.
- Dobson M, 1999. "The malariology centenary." Parassitologia **41**: 21-32.
- Engelbrecht F., Felger I., Genton B., Alpers M et Beck HP, 1995. "*Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes." Experimental Parasitology **81**: 90-96.
- Engelbrecht F., Tögel, E., Beck HP., Enwezor F., Oettli A et Felger I, 2000. "Analysis of *P. falciparum* infections in a village community in Northern Nigeria: determination of *msp2* genotypes and parasites-specific IgG responses." Acta Tropica **74**: 63-71.
- Esposito F., Lombardi S., Modiano D., Zavala F., Reeme J., Lamizana L. , Coluzzi M, Nussenzweig RS, 1988. "Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their

- relationship to resistance against malaria infection." Trans R Soc Trop Med Hyg **82**(6): 827-32.
- Excoffier L., Estoup A., Cornuet JM, 2005. "Bayesian Analysis of an Admixture Model With Mutations and Arbitrarily Linked Markers." Genetics **169**: 1727-1738.
- Excoffier L., Smouse P. et Quattro J, 1992. " Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data." Genetics **131**: 479-491.
- Fantini B, 1999. "The concept of specificity and the Italian contribution to the discovery of the malaria transmission cycle." Parassitologia **41**: 39-47.
- Felger I., Hubert W., Steiger S., Smith T., Weiss N., Tanner M et Beck H-P, 1996. "Multiplicity of *P. falciparum*. High multiplicity of *P. falciparum* is associated with reduced risk of clinical malaria in Tanzanian children. (Article non publié)." 18p.
- Felger I., Smith T., Etoh D., Kitua A., Alonso P., Tanner M and Beck H-P, 1999. "Multiple *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian infants." Trans R Soc Trop Med Hyg suppl **1,93**: S1/29-S1/34.
- Felger I., Tavul L., Kabintik S., Marshall V., Genton B., Al pers., M et Beck HP, 1999. *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface protein 2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea." Experimental Parasitology **79**: 106-116.
- Fenton B., Clark JT., Anjam Khan CM., Robinson JV., Walliker D., Ridley R., Scaife G et McBride JS, 1991. " Structural and antigenic polymorphism of the 35 to 48 kilo Dalton merozoite surface protein (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Molecular and Cell Biology **11**: 963-974.

- Gardner JM., Neil Hall, Eula F., Owen W., Matthew B., Richard WH., Jane MC., Arnab P., Karen EN., Sharen B., Ian TP., Keith J., Jonathan AE., Kim R., Steven LS., Alister C., Sue K., Man-Suen C., Vishvanath N., Shamira JS., Bernard S., Jeremy P., Sam A., Mihaela P., Jonathan A., Jeremy S., Daniel H., Michael WM., Akhil BV., David Martin MA., Alan HF., Martin JF., David SR., Stuart AR., Geoffrey IM., Leda MC., Mani Subramanian G., Chris Mungall., Craig VJ., Daniel JC., Hoffman SL, Chris N., Ronald WD., Fraser CM et Bart B, 2002. "Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Nature **419**: 498-511.
- Gardner MJ., Tettelin H., Carucci DJ., Cummings LM., Aravind L., Koonin EV., Shallom S. Mason T., Yu K., Fujii C., Pederson J., Shen K., Jing J., Aston C., Lai Z., Schwartz DC., Pertea M., Salzberg S., Zhou L., Sutton GG., Clayton R., White O., Smith HO., Fraser CM., Adams MD., Venter JC et Hoffman SL, 1998. "Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*." Science **282**: 1126-1132.
- Gentilini M, 1993. "Le paludisme. Dans." Médecine tropicale. 5^o édition. Paris: Flammarion: 91-122.
- Giglioli G, 1951. "Nation-wide malaria eradication projects in the Americas. III. Eradication of *Anopheles darlingi* from the inhabited areas of British Guiana by DDT residual spraying." J Natl Malar Soc **10**: 142-161.
- Glockner G., Eichinger L., Szafranski K., Pachebat JA., Bankier AT, Dear PH., Lehmann R, Baumgart C., Parra G., Abril JF., Guigo R et Kumpf K, 2002. "Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*." Nature **418**: 79-85.

- Gordon D., McGovern TW., Krzych U., Cohen JC., Schneider I., LaChance R et Heppner DG, Yuan G., Hollingdale M., Slaoui M., Hauser P., Voet P., Sadoff JC et Ballou WR, 1995. "Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein hepatitis B surface antigen subunit vaccine." J Infect Dis **171(6)**: 1576-85.
- Gratzer WB. et Dluzewski, 1993. "The Red Blood Cell and Malaria Parasite Invasion." Seminars in Hematology **30 (3)**: 232-247.
- Graves P et Gelband H, 2003. "Vaccines for preventing malaria." Cochrane Database Syst Rev **1 (CD000129)**.
- Guinko S, 1984. La végétation de la Haute Volta. Paris : Université de Bordeaux III, Thèse de doctorat ès sciences naturelles, 394 p
- Gustincich S., Manfioletti G., Del Sal G et Schneider C, 1991. "A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood." Biotechniques **11, n°3**: 298-302.
- Haddad D., Snounou G., Mattei D., Enamorado IG., Figueroa J., Stahl S et Berzins K, 1999. "Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras." Am J Trop Med Hyg **60(1)**: 30-4.
- Hartl DL et Clark AG, 1989. «Principles of Population Genetics." 2 ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.: 118-119.
- Hoffman SL., Bancroft WH., Gottlieb M., James SL., Burroughs EC., Stephenson JR et Morgan MJ, 1997. "Funding for malaria genome sequencing." Nature: 387: 647.
- Holt RA., Subramanian GM., Halpern A., Sutton GG., Charlab R., Nuskern DR., Wincker P., Clark AG., Ribeiro JM., Wides R., Salzberg SL., Loftus B., Yandell M., Majoros WH., Rusch DB., Lai Z., Kraft CL., Abril JF., Anthouard V., Arensburger P., Atkinson PW., Baden H., de Berardinis V., Baldwin D., Benes

V., Biedler J., Blass C., Bolanos R., Boscus D., Barnstead M., Cai S., Center A., Chatuverdi K., Christophides GK., Chrystal MA., Clamp M., Cravchik A., Curwen V., Dana A., Delcher A., Dew I., Evans CA., Flanigan M., Grundschober-Freimoser A., Friedli L., Gu Z., Guan P., Guigo R., Hillenmeyer ME., Hladun SL., Hogan JR., Hong YS., Hoover J., Jaillon O., Ke Z., Kodira C., Kokoza E., Koutsos A., Letunic I., Levitsky A., Liang Y., Lin JJ., Lobo NF., Lopez JR., Malek J.A., McIntosh TC., Meister S., Miller J., Mobarry C., Mongin E., Murphy S.D., O'Brochta DA., Pfannkoch C., Qi R., Regier MA., Remington K., Shao H., Sharakhova MV., Sitter CD., Shetty J., Smith TJ., Strong R., Sun J., Thomasova D., Ton LQ., Topalis P., Tu Z., Unger MF., Walenz B., Wang A., Wang J., Wang M., Wang X., Woodford KJ., Wortman JR., Wu M., Yao A., Zdobnov EM., Zhang H., Zhao Q., Zhao S., Zhu SC., Zhimulev I., Coluzzi M., della Torre A., Roth CW., Louis C., Kalush F., Mural RJ., Myers EW., Adams M.D., Smith HO., Broder S., Gardner MJ., Fraser CM., Birney E., Bork P., Brey PT., Venter JC., Weissenbach J., Kafatos FC., Collins FH et Hoffman SL, 2002. "The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*." Science **298**: 129-149.

Issifou S., Djikou S., Sanni A., Lekoulou F et Ntoumi F, 2001. "Pas d'influence de la saison de transmission ni de l'âge des patients sur la complexité et la diversité génétique des infections dues à *Plasmodium falciparum* à Cotonou (Bénin)." Bull Soc Pathol Exot **94, 2 bis**: 195-198.

Kemp D, 1992. "Antigen diversity and variation in blood stages of *P. falciparum*." Immunology and cell Biology **70**: 201-207.

Klotz F., Orlandi PA., Reuter G., Cohen SJ., Haynes JD., Schauer R., Howard RJ., Palese P et Miller LH, 1992. "Binding of *Plasmodium falciparum* 175-kilodalton

- erythrocyte binding antigen and invasion of murine erythrocytes requires N-acetylneuraminic acid but not its O-acetylated form." Mol Biochem Parasitol **51**(1): 49-54.
- Magesa S., Mdira KY., Babiker HA., Alifrangis M., Farnert A., Simonsen PE., Bygbjerg IC., Walliker D et Jacobsen PH, 2002. "Diversity of *Plasmodium falciparum* clones infecting children living in a holoendemic area in north-eastern Tanzania." Acta Trop **84**(2): 83-92.
- Majori G., Sabatinelli G et Coluzzi M, 1987. "Efficacy of permethrin impregnated curtains for malaria vector control." Med Vet Entomol **1**: 185-192.
- Marcelo U., Weber LR., Angela PT., Fumihiko K et Stephen MR, 2003. "Sequence diversity and evolution of the malaria vaccine candidate merozoite surface protein-1 (MSP-1) of *Plasmodium falciparum*." Gene **304**: 65-75.
- Marshall V., Anthony RL., Bangs PMJ., Anders RF et Coppel RL, 1994. "Allelic variants of *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2 (MSP-2) in geographically restricted area of Irian java." Molecular and Biochemical Parasitology **63**: 13-21.
- Mazier D, 1991. "Cycle et biologie des plasmodies. Dans: Gentilini.M. Paludisme. Paris." Edition Marketing / Ellipses: 26-33.
- Meissner P., Mandi G., Mockenhaupt FP., Witte S., Coulibaly B., Mansmann U., Frey C., Merkle H., Burhenne J., Walter-Sack I., Muller O., 2008. "Marked differences in the prevalence of chloroquine resistance between urban and rural communities in Burkina Faso." Acta Trop **105**(1): 81-86.
- Meyer CG., May J., Arez AP., Gil JP et Rosario V, 2002. "Genetic diversity of *P. falciparum*: asexual stages." Tropical medicine and International Health. **7**: 395-408.

- Miller LH., Roberts T., Shahabuddin M. et Mccutchan TF, 1993. "Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1)." Molecular and Biochemical Parasitology **59**: 1-4.
- Millet P., Campbell GH, Sulzer AJ., Grady KK, Pohl J., Aikawa M et Collins WE, 1993. "Immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* asexual blood-stage synthetic peptide vaccine SPf66." Am J Trop Med Hyg **48**: 424-431.
- Missinou M., Kun JF., Lell B et Kremsner PG, 2001. "Change in *Plasmodium falciparum* genotype during successive malaria episodes in Gabonese children." Parasitol Res **87**(12): 1020-3.
- Mockenhaupt F., Ehrhardt S., Eggelte TA., Markert M., Anemana S., Otchwemah R et Bienzle U, 2003. "*Plasmodium falciparum* multiplicity correlate with anaemia in symptomatic malaria." Tropical Medecine and International Health, **8**, n°10: 857-859.
- Modiano D., Sirima BS., Sawadogo A., Sanou I., Pare J., Konate A et Pagnoni, F. al., 1999. "Severe malaria in Burkina Faso: urban and rural environment." Parassitologia **41**(1-3): 251-4.
- Narum DL et Thomas AW, 1994. "Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites." Mol Biochem Parasitol **67**: 59-68.
- Nebié I, 2002. L'influence a long terme des rideaux impregnes d'insecticides sur l'immunité antipalustre chez des enfants vivant en zone rurale au Burkina Faso. UFR/SVT. Ouagadougou, Universite de Ouagadougou: 136 p.
- Nebie I., Diarra A., Ouedraogo A., Soulama I., Bougouma EC., Tiono AB., Konate AT., Chilengi R., Theisen M., Doodoo D., Remarque E., Bosomprah S., Milligan P et Sirima SB, 2008. "Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage

- antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa." Infect Immun **76(2)**: 759-66.
- Nei M, 1987. "Molecular Evolutionary Genetics." Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Newton C., Warm PA., Winstanley PA., Peshu N., Snow RW., Pasvol G et Marsh, K, 1997. "Severe anaemia in children living in a malaria endemic area of Kenya." Tropical Medicine and International Health **2, n° 2**: 165-178.
- Nosny P, 1980. "[Alphonse Laveran and the discovery of the malarial parasite]." Bull Acad Natl Med **64**: 80-87.
- Ntoumi F., Contamin H., Rogier C., Bonnefoy S., Trape JF et Mercereau Puijalon O, 1995. "Age dependent carriage of multiple *P. falciparum* merozoite surface protein-2 alleles in asymptomatic malaria infections." Am J Trop Med Hyg **52**: 81-88.
- Ntoumi F., Ngoundou-Landji J., Luty AJF., Dubreuil G et Millet P, 2001. "Polymorphisme allélique du gène *msp2* de *Plasmodium falciparum* analysé à partir d'échantillons sanguins d'enfants gabonais." Bull Soc Pathol Exot **94, 2 bis**: 183-18722.
- Pe Than M. et Tin S, 1986". The efficacy of artemether (qinghaosu) in *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in Burma." Southeast Asian J Trop Med Public Health **17**: 19-22.
- Peter Van den Eede., Hong NV., Chantal VO., Indra Vythilingam, Thang ND., Le Xuan Hung., Hung NM., Jozef A., D'Alessandro U et Annette Erhart, 2009. Human *Plasmodium knowlesi* infections in young children in central Vietnam. Malaria Journal, **8**:249

- Petrarca V., Petrangeli G., Rossi P et Sabatinelli G, 1996. " Antimalarial campaign program in Ouagadougou (Burkina Faso): The Anopheles gambiae complex in the city of Ouagadougou and surrounding villages." Ann Ist Super Sanita **22**, n°1: 189-191.
- Plowe C., Djimde A., Bouare M., Doumbo O et Wellems TE, 1995. "Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa." Am J Trop Med Hyg **52**(6): 565-8.
- Rich S et Ayala FJ, 2003. "Progress in malaria research: the case for phylogenetics." Adv Parasitol **54**: 255-80.
- Robert F., Ntoumi F., Angel G., Candito C., Rogier C., Fandeur T., Sarthou JL et Mercereau-Puijalon O, 1996. "Extensive genetic diversity of *P. falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. Trans R Soc Trop Med Hyg." **90**: 704-711.
- Rogier C., Orlandi-Pradines E., Fusai T., Pradines B., Briolant S et Almeras L, 2006. Vaccins contre le paludisme: perspectives et réalité Malaria vaccines. Médecine et maladies infectieuses **36**: 414-422
- Roper C., Richardson W., Elhassan IM., Giha H., Hviid L., Satti GM., Theander TG et ARNOT DE, 1998. "Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village." Parasitology **116** (Pt 6): 501-10.
- Sim B., Chitnis CE., Wasniowska K., Hadley TJ et Miller LH, 1994. "Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*." Science **264**: 1941-1944.

- Sinou V, 1998. "Nouvelles approches dans la morphogenèse du Plasmodium et du trypanosome: Incidences en chimiothérapie." Thèse Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Poitiers: 115 p.
- Sirima B., Soulama I., Tiono AB et Konate AT, 2003. Données de base pour le suivi et l'évaluation de l'initiative "Faire reculer le Paludisme" et "Situation de la mise en œuvre de l'initiative "Faire Reculer le Paludisme"dans les zones pilotes. Ouagadougou, Programme National de Lutte contre le Paludisme: 72 p.
- Smith T., Felger I., Etoh D., Kitua A., Tanner M et Beck HP, 1999. "Dynamics of multiple *P. falciparum* infections in infants in a highly endemic area of Tanzania." Trans R Soc Trop Med Hyg **93**, **Suppl 1**: S1/35 - S1/39.
- Smyth J., Coppel RL., Dary KP., Martin RK., Oduola AMJ., Kemp DJ et Anders RF, 1991. "Structure diversity in the *P. falciparum* merozoite surface antigen 2." Proc. Natl. Acad. Science **88**: 1751-1755.
- Snewin V., Herrera M., Sanchez G., Scherf A., Langsley G et Herrera S, 1991. "Polymorphism of the alleles of the merozoite surface antigens MSA1 and MSA2 in *Plasmodium falciparum* wild isolates from Colombia." Molecular and Biochemical Parasitology **49**: 265-276.
- Snounou G et Beck HP, 1998. "The Use of PCR Genotyping in the Assessment of Recrudescence or Reinfection after Antimalarial Drug Treatment." Parasitology Today **14 (11)**: 462-467.
- Takala SL., Coulibaly D., Thera MA., Dicko A., Smith DL., Guindo AB., Kone AK., Traore K., Ouattara A., Djimde AA., Sehdev PS., Lyke KE., Diallo DA., Doumbo OK et Plowe CV, 2007. "Dynamics of Polymorphism in a Malaria Vaccine Antigen at a Vaccine-Testing Site in Mali." PLoS Med.**4(3)**:e93.

- Talisuna A., Bloland P et D'Alessandro U, 2004. "History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance." Clin Microbiol Rev **17**: 235-254.
- Thomas A., Carr DA., Carter JM et Lyon JA, 1990. "Sequence comparison of allelic forms of the *P. falciparum* merozoite surface antigen MSA-2." Molecular and Biochemical Parasitology **43**: 211-220.
- Toure F., Bisseye C et Mavoungou E, 2006. "Imbalanced distribution of *Plasmodium falciparum* EBA-175 genotypes related to clinical status in children from Bakoumba, Gabon." Clin Med Res **4**(1): 7-11.
- Toure F., Mavoungou E., Ndong JM., Tshipamba P et Deloron P, 2001. "Erythrocyte binding antigen (EBA-175) of *Plasmodium falciparum*: improved genotype determination by nested polymerase chain reaction." Trop Med Int Health **6**: 767-769.
- Trager W et Jensen JB, 1976. "Human malaria parasites in continuous culture." Science **193**: 673-675.
- Triglia T., Wellems TE et Kemp DJ, 1992. "Towards a high resolution map of the *P. falciparum* genome." Parasitology Today **8**: 225-229.
- Viriyakosol S., Siripoon N., Petcharapirat C., Petcharapirat P., Jarra W., Thaitong S Brown KN et Snounou G, 1995. "Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies." Bull World Health Organ **73**(1): 85-95.
- Vivier E et Desportes I, 1989." Phylum Apicomplexa." Handbook of Protoctista **Chapter 30**: 549-573.
- Zwetyenga J., Rogier C., Tall A., Fontenille D., Snounou G., Trape JF et Mercereau-Puijalon O, 1998. "No influence of age on infection complexity an allelic

distribution in *P. falciparum* in fection in Ndiop, a Senegalese village with seasonal mesoendemic malaria." Am J Top Med Hyg **59**: 726-735.

DOCUMENTS CONSULTES

- DEP (2007). Annuaire Statistique Edition 2006, Burkina Faso.
- DEP (2009). "" Annuaire Statistique Edition 2008, Burkina Faso: 413p.
- Ministère Habitat Urbanisme (2008). "Habitat et Urbanisme au Burkina Faso." Rapport d'études: 140p.
- OMS (1990). "Division de la lutte contre les maladies tropicales. Formes graves et compliquées du paludisme." Trans. of the Royal Society of Trop. Med. and Hyg **84**: 73 p.
- WHO, 2000. "Severe *P. falciparum* malaria." Trans. of The Royal Society of Trop. Med. and Hyg. **94, Suppl 1**: 90 p.
- WHO (2002). Monitoring antimalarial drug resistance. Geneva, WHO.
- WHO,2009.Report.http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/index.html:.78
- WHO (2000a). "WHO Expert Committee on Malaria." World Health Organization, Geneva Twentieth Report.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste et séquences des amorces

Amorces MSP1, MSP2 et GLURP

	5'		3'
		<i>msp-2</i>	
MSP2 1		ATG AAG GTA ATT AAA ACA TTG TCT ATT ATA	
MSP2 4		ATA TGG CAA AAG ATA AAA CAA GTG TTG CTG	
FC27 A		GCA AAT GAA GGT TCT AAT ACT AAT AG	
FC27 B		GCT TTG GGT CCT TCT TCA GTT GAT TC	
3D7 A		GCA GAA AGT AAG CCT TCT ACT GGT GCT	
3D7 B		GAT TTG TTT CGG CAT TAT TAT GA	
		<i>msp-1</i>	
Msp1 A		AAG CTT TAG AAG ATG CAG TAT TGA C	
Msp1 B		ATT CAT TAA TTT CTT CAT ATC CAT C	
K1A		AAG AAA TTA CTA CAA AAG GTG CAA GTG	
K1B		AGA TGA AGT ATT TGA ACG AGG TAA AGT G	
Ro33 A		AGG ATT TGC AGC ACC TGG AGA TCT	
Ro33 B		GAG CAA ATA CTC AAG TTG TTG CAA AGC	
Mad20A		TGA ATT ATC TGA AGG ATT TGT ACG TCT TGA	
Mad20B		GAA CAA GTC GAA CAG CTG TTA	
		<i>eba-175</i>	
eba1		CAA GAA GCA GTT CCT GAG GAA	
eba2		TCT CAA CAT TCA TAT TAA CAA TTC	
eba3		GAG GAA AAC ACT GAA ATA GCA CAC	
eba4		CAA TTC CTC CAG ACT GTT GAA CAT	

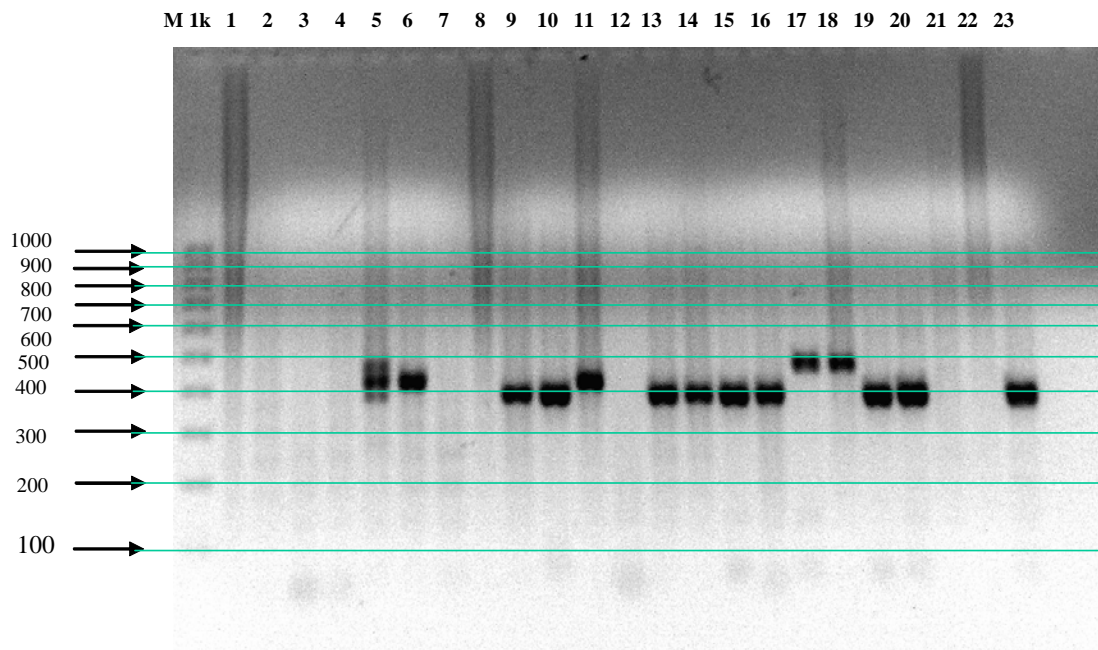
Annexe 2a : exemple de gel d'agarose

FC27 sur PTC -100

Primers de SIGMA 2µl de PCR - MSP2

Agarose 1,5 % Suivi longitudinal Pissy

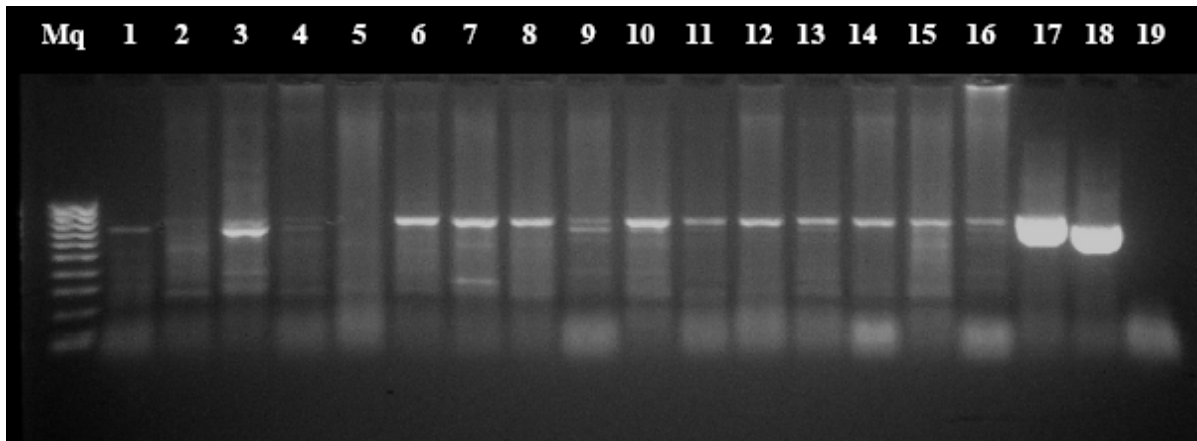
FC27



1.	Marqueur
2.	033 J0
3.	033 J21
4.	048 J0
5.	048 J13
6.	050 J0
7.	050 J21
8.	053 J0
9.	053 J14
10.	056 J0
11.	056 J14
12.	062 J0
13.	062 J11

13.	063 J0
14.	063 J21
15.	067 J0
16.	067 J13
17.	068 J0
18.	068 J14
19.	069 J0
20.	069 J21
21.	C-
22.	H2O
23.	C+

Annexe 2b : exemple de gel d'agarose



Nested PCR des produits d'*eba-175*

Puits Mq: Maqueur de Poids moléculaire 100 pb; **Puits 1, 6-8, 11-16:** Fragments FCR-3 ; **Puits 3, 4, 9:** Infections mixtes (FCR-3 plus CAMP); **Puits 17:** Contrôle positif FCR-3; **Puits 18:** Contrôle positif CAMP; **Puits 19:** control négatif

Annexe 3 : Article sur la diversité génétique et formes cliniques du paludisme

PARASITOLOGIE

Diversité génétique de *Plasmodium falciparum* et pathogénie de l'anémie palustre sévère chez des enfants de moins de 5 ans de la province du Boulgou, Burkina Faso.

I. Soulama (1), M. Sawadogo (2), I. Nebic (1), A. Diarra (1), A. B. Tiono (1), A. Konate (1) & S. B. Sirima (1)

(1) Centre national de recherche et de formation sur le paludisme, Ministère de la santé, 01 BP 2208 Ouagadougou 01 Burkina Faso. E-mail : s.sirima.cnlp@fasonet.bf
(2) Unité de formation et de recherche en science de la santé, Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 01 Burkina Faso

Manuscrit n° 2852. "Parasitologie". Reçu le 24 août 2005. Accepté le 22 novembre 2005.

Summary: Genetic diversity of *P. falciparum* and pathogenesis of the severe malarial anaemia in children under 5 years old in the province of Boulgou, Burkina Faso.

The clinical presentation of malaria mainly the severe form may be related to *Plasmodium falciparum* msp-2 (merozoite surface protein 2) specific family. To verify this hypothesis, during the high malaria transmission season in 2001; we analyzed the allelic polymorphism of the msp-2 gene of *P. falciparum* in children under 5 years old with different presentation of malaria in the regional Hospital and at community level in the Boulgou Province (Burkina Faso). A total of 405 children (107 severe malarial anaemia cases, 102 severe malaria cases without severe anaemia and 196 non severe malaria cases) were enrolled in the study. The frequencies of the FC27 were 89.2% in severe malarial anaemia children group, then 89.7% and 86.9% respectively in severe malaria non anaemic children cases and non severe malaria cases ($P=0.4$). The frequencies of the 3D7 were 72.5%; 84.1% and 77% respectively severe malaria non anaemic children, severe malarial anaemia cases and non severe malaria cases ($P=0.7$). The complexity of the FC27 genotypes was significantly higher in children with severe malaria (with and without severe anaemia) compared to the non severe malarial children ($P<<0.001$). No significant difference was pointed up in the complexity of the 3D7 genotypes.

polymorphism
msp-2 gene
Plasmodium falciparum
pathogenesis
severe malarial anaemia
Zano
Gourganbaga
Tenkodogo
Boulgou
Burkina Faso
Sub-Saharan Africa

Résumé:

Dans le but de vérifier si l'anémie palustre sévère était spécifiquement associée à une famille allélique du gène msp-2 (merozoïte surface protein 2) de *P. falciparum*, nous avons étudié durant la saison de transmission maximale du paludisme (juin à octobre) de l'année 2001, la diversité génétique de *P. falciparum* en utilisant le marqueur génétique msp-2 chez des enfants de moins de 5 ans porteurs du parasite dans la province du Boulgou (Burkina Faso). Un total de 405 enfants dont 107 enfants avec anémie palustre sévère, 102 enfants avec paludisme grave sans anémie sévère et 196 cas avec paludisme non grave ont été inclus dans cette étude. La fréquence des familles alléliques FC27 et 3D7 était respectivement de 89,2% et 72,5% dans les cas graves avec anémie sévère; 89,7 % et 84,1% dans les cas graves sans anémie; 86,9% et 77% dans les cas de paludisme sans forme de sévérité ($p = 0,4$ pour FC27 et $p = 0,7$ pour 3D7). La complexité des génotypes FC27 était significativement plus élevée ($p < 10^{-5}$) chez les enfants présentant un paludisme grave d'une manière générale que dans les cas non graves.

polymorphisme génétique
gène msp-2
Plasmodium falciparum
pathogénie
anémie palustre sévère
Zano
Gourganbaga
Tenkodogo
Boulgou
Burkina Faso
Afrique intertropicale

Introduction

En zone endémique, en fonction du faciès épidémiologique, le paludisme se présente sous différentes formes cliniques : asymptomatique, simple ou grave. Les formes graves dues essentiellement à *Plasmodium falciparum* sont responsables de la plupart des décès, notamment chez les enfants de moins de 5 ans. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la sévérité des infections palustres dues à *P. falciparum* : les facteurs nutritionnels, le statut immunitaire de l'individu, certaines caractéristiques génétiques de l'individu et/ou du parasite (1, 24).

L'existence de souches plasmodyales plus virulentes que d'autres a été évoquée depuis très longtemps, et fait encore

l'objet d'une attention (13). Cependant, sur les facteurs parasitaires qui seraient responsables d'une augmentation de la virulence ou des manifestations cliniques spécifiques, peu de connaissances sont disponibles. CARLSON *et al.* (5) et ROWE *et al.* (26) notaient une association entre les formes en rosettes de *P. falciparum* et le paludisme cérébral, alors que CLOUGH *et al.* (6) obtenaient des résultats contradictoires. En outre, il a été souligné qu'une faible fréquence de multiples génotypes parasitaires est associée à la sévérité de l'infection palustre au Sénégal (25) et à une plus grande morbidité palustre en Papouasie-Nouvelle Guinée (2).

Le présent travail a eu pour objectif de vérifier si une famille allélique du gène msp-2 de *P. falciparum* était associée à des formes cliniques particulières de paludisme, notamment

l'anémie palustre sévère, qui constitue la forme de paludisme grave la plus fréquente en milieu rural au Burkina Faso (19). Pour cela, nous avons utilisé la région centrale du gène *msp-2* (merozoïte surface protein 2) comme marqueur de polymorphisme pour étudier les familles alléliques *msp-2* (FC27 et 3D7) de *P. falciparum* chez des malades atteints de paludisme grave et chez des malades atteints de paludisme non grave, tous vivants dans la province du Boulgou, une région endémique à l'est du Burkina Faso. La zone centrale du gène *msp-2* est très polymorphe et est beaucoup utilisée dans les enquêtes épidémiologiques pour l'étude du polymorphisme génétique du *P. falciparum* (3,7).

Matériel et méthodes

Le site d'étude

Notre zone d'étude a été la province du Boulgou située au centre-est du Burkina Faso, à la frontière du Togo. La province du Boulgou est caractérisée par une saison pluvieuse (de juin à octobre), où la transmission du paludisme est maximale, et par une saison sèche (de novembre à mai) avec un faible niveau de transmission. À l'instar du reste du pays, *Anopheles gambiae*, *An. arabiensis* et *An. funestus* y sont les principaux vecteurs du paludisme (16, 23).

Recrutement des patients

Les sujets de notre étude étaient composés d'enfants porteurs de *P. falciparum* avec ou sans signes de gravité.

Les définitions opérationnelles suivantes ont été retenues :

– cas de paludisme grave : enfants âgés de 6 mois à 5 ans avec un tableau clinique de paludisme répondant aux critères de gravité de l'OMS (22). Parmi ces cas graves, nous avons distingué les cas graves avec anémie sévère (taux d'hémoglobine < 5 g/dl) des cas graves sans anémie sévère (taux d'hémoglobine ≥ 5 g/dl);

– cas non graves de paludisme : enfants de moins de 5 ans porteurs de *Plasmodium*, mais ne répondant pas à la définition de paludisme grave de l'OMS (22). Il s'agissait donc de porteurs asymptomatiques ou des cas de paludisme simple.

Les enfants répondant à la définition du paludisme grave ont été enrôlés dans l'étude au niveau du service des urgences pédiatriques du centre hospitalier régional de Tenkodogo. Les cas de paludisme non grave ont, quant à eux, été recrutés au niveau de la communauté, lors d'une enquête transversale à Zano et Gourganbaga, deux villages du département de Tenkodogo, le chef lieu de la province du Boulgou.

Le consentement oral éclairé des parents de tous les enfants a été obtenu avant leur inclusion dans l'étude. Tous les patients inclus dans l'étude ont bénéficié d'une prise en charge médicalement gratuite adaptée à leur tableau clinique.

Prélèvement des échantillons sanguins

Un prélèvement capillaire à la pulpe du doigt a été effectué chez tous les enfants. Ce prélèvement a permis la confection d'une goutte épaisse et un frottis sanguin mince pour la recherche des parasites, le dosage du taux d'hémoglobine et de la glycémie. Le taux d'hémoglobine et la glycémie ont été dosés sur le terrain (pour les cas de paludisme non grave) ou au lit du malade (pour les cas graves)

grâce à des appareils portatifs : l'Hemocue® pour le taux d'hémoglobine et le glycomètre pour la glycémie.

Un autre prélèvement veineux de 0,5 ml dans des tubes contenant de l'EDTA a été effectué pour la génétique moléculaire de *P. falciparum*.

Techniques de typages de *P. falciparum*

Ce typage comportait l'extraction de l'ADN parasitaire, son amplification et l'électrophorèse des produits d'amplification.

Extraction de l'ADN parasitaire

L'ADN a été extrait selon la technique dodécyl-triammonium-bromide (DTAB)-cétyl-triammonium-bromide (CTAB) décrite par GUSTINCICH *et al.* (14).

Dans notre étude, 300 µl de sang total prélevés sur EDTA étaient utilisés par échantillon. Après la lyse des globules rouges avec 15 µl d'une solution de saponine à 1 % et 300 µl d'une solution de DTAB à 12 %, l'ADN parasitaire est purifié avec 700 µl de solution de chloroforme. Cet extrait d'ADN est ensuite précipité par 1 ml d'une solution de CTAB à 0,5 % et par de l'éthanol à 99,5 %. Le précipité obtenu est ensuite suspendu dans 50-100 µl d'eau stérile et conservé à -20 °C.

Typage génétique de *msp-2* de *P. falciparum*

La région centrale dimorphique et variable du gène de la protéine de surface du mérozoïte *msp-2* de *P. falciparum* permet d'identifier deux familles alléliques FC27 et 3D7. La technique d'amplification utilisée dans cette étude est celle décrite par VIRIYAKOSOL *et al.* (28). Brièvement, une amplification primaire non spécifique est réalisée en utilisant les amorces M2OF et M2OR avec 1 µl de l'extrait d'ADN, suivie d'une amplification secondaire (spécifique) utilisant 1 µl du produit de la PCR primaire comme matrice avec des amorces spécifiques au type des deux familles d'allèles à amplifier : FC27 A/B et 3D7 A/B. Toutes les amplifications ont été réalisées avec un volume final de 20 µl.

Électrophorèse des produits PCR

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % (m/v) de la solution de tris base - borate - EDTA. Ces fragments sont visualisés sous lumière UV grâce au bromide d'éthidium et ensuite photographiés.

Interprétation des résultats

Il s'agissait, après traitement des photos (scannées), de déterminer la taille des bandes ou fragments, ainsi que le nombre de fragments ou génotypes différents par isolat.

Analyse statistique

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel Epi info® version 6.0.

Les tests de χ^2 de Pearson et le test de Fisher ont été utilisés pour la comparaison des proportions. Le test de Student et l'analyse de variance ont été utilisés pour la comparaison des

Tableau I.

Fréquence des souches 3D7 et FC27 de *P. falciparum* en fonction des entités cliniques.
Frequency of 3D7 and FC27 strains of *P. falciparum* according to clinical entities.

	PGAS			cas graves			total			cas non graves		
	nb	%	IC	nb	%	IC	nb	%	IC	nb	%	IC
3D7	74	72,5	63,8-81,2	90	84,1	77,2-91,0	164	78,5	72,9-84,1	151	77	71,1-82,9
FC27	91	89,2	83,2-95,2	96	89,7	83,9-95,5	187	89,5	85,3-93,7	170	86,7	82,0-91,5
total	102			107			209			196		

p 3D7 (cas graves vs cas non graves) = 0,7
p FC27 (cas graves vs cas non graves) = 0,4
p 3D7 (PGAS vs cas non graves) = 0,1
p FC27 (PGAS vs cas non graves) = 0,4

p 3D7 (PGAS vs cas non graves) = 0,4
p FC27 (PGAS vs cas non graves) = 0,5
p 3D7 (PGAS vs PGAS) = 0,04
p FC27 (PGAS vs PGAS) = 0,9

moyennes. La valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme seuil de significativité pour les différents tests statistiques.

Résultats

Au total, 405 enfants de moins de 5 ans ont été inclus dans notre étude : 209 ont présenté un tableau de paludisme grave et 196 un tableau de paludisme non grave. Parmi les enfants admis dans un tableau de paludisme grave, 102 enfants avaient une anémie sévère. L'âge moyen (\pm écart-type) était de 1,3 ans ($\pm 0,9$) dans les cas de paludisme grave avec anémie sévère (PGAS); 1,9 ans ($\pm 1,2$) dans les cas de paludisme grave sans anémie sévère (PGSAS) et 3,0 ans ($\pm 1,6$) dans les cas de paludisme non grave (PNG).

Fréquence des familles alléliques 3D7 et FC27 de *P. falciparum*

D'une manière générale, chez les patients de l'étude porteurs de *P. falciparum*, les fréquences des familles alléliques 3D7 et FC27 des souches parasitaires étaient respectivement de 77,8 % (IC₉₅ % : 73,8-81,9) et 88,2 % (IC₉₅ % : 85,1-91,3). Cette différence est statistiquement significative ($P < 0,001$).

En fonction de la sévérité du paludisme, les fréquences des familles alléliques 3D7 et FC27 de *P. falciparum* étaient sensiblement les mêmes chez les malades atteints de paludisme grave (PGSAS et PGAS) que dans les cas de paludisme non grave (tableau I). En comparant les fréquences de ces deux familles alléliques 3D7 et FC27 chez les PNG et les PGSAS, la différence n'est pas statistiquement significative (tableau I). Entre PGAS et PGSAS, une différence statistiquement significative n'a été mise en évidence que sur la fréquence de la famille allélique 3D7 (tableau I).

L'analyse de la fréquence des familles alléliques 3D7 et FC27 en fonction de l'âge dans les trois entités cliniques n'a montré aucune différence (tableau II).

Complexité des génotypes 3D7 et FC27

En définissant la complexité comme le nombre moyen de génotypes parasitaires présents chez un sujet, on note chez les patients de l'échantillon d'une manière générale que le nombre moyen de génotypes parasitaires chez les PNG, PGAS,

et PGSAS était respectivement de 2,4 ($\pm 1,6$); 2,9 ($\pm 1,6$) et 2,9 ($\pm 1,4$).

L'analyse de la complexité individuelle des familles alléliques du gène *msp-2* a montré que, de façon spécifique, ni la complexité au sein de la famille allélique 3D7, ni au niveau de la famille FC27 ne variait avec l'âge, et cela quelle que soit l'entité clinique considérée (tableau III). Cependant, en combinant les complexités (génotypes 3D7+FC27), un nombre maximal de génotypes parasitaires est observé dans les cas de PGSAS âgés d'un an (tableau III).

Selon la sévérité du paludisme, la complexité des génotypes FC27 était statistiquement plus élevée dans les cas de paludisme grave, avec ou sans anémie sévère, comparée aux cas de paludisme non grave (tableau III). Dans le groupe de patients avec paludisme grave, la complexité des génotypes 3D7 était significativement plus élevée dans les cas de PGSAS comparés aux cas de PGAS; à l'inverse, la complexité des génotypes FC27 était plus élevée dans les cas de PGAS comparée aux cas de PGSAS.

Polyclonalité de l'infection

La polyclonalité de l'infection, définie comme étant la proportion des enfants ayant plus d'un clone de *P. falciparum*, est représentée par la figure 1. Ainsi, quelque soit le tableau clinique, 79 % (75,6-83,4) des patients de l'échantillon étaient parasités par plus d'un clone de *P. falciparum*.

Figure 1.

Polyclonalité de l'infection par *P. falciparum* en fonction des entités cliniques.
Polyclonality of *P. falciparum* infection according to clinical entities

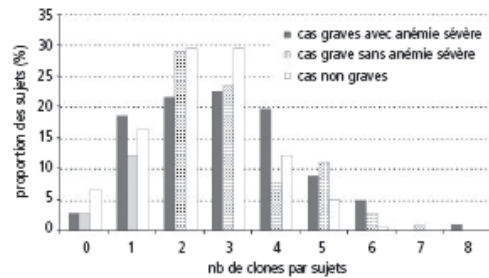


Tableau II.

Fréquence des familles alléliques FC27 et 3D7 en fonction de l'âge.
Frequency of the FC27 and 3D7 allelic families according to age.

âge	PGAS						PGSAS						PNG					
	n	3D7 %	FC27 %	IC	n	3D7 %	FC27 %	IC	n	3D7 %	FC27 %	IC	n	3D7 %	FC27 %	IC		
< 1 an	40	75,5	63,9-87,1	46	86,8	77,7-95,9	22	81,5	67,1-95,9	25	92,6	82,9-102,3	10	76,9	53,9-99,8	11	84,6	65-104,2
1 an	26	78,8	64,5-92,5	31	93,9	85,7-102	32	94,1	86,2-102	30	88,2	77,4-99,0	24	80,0	65,7-94,3	27	90,0	79,3-100,7
2-5 ans	8	50	25,5-74,5	14	87,5	71,3-103,7	36	80,0	68,3-91,7	41	91,1	82,4-99,8	117	76,5	69,8-83,2	132	86,3	80,9-91,8
p	0,08		0,05		0,15		0,9		0,9		0,8							

Tableau III.

Complexité des génotypes de type FC27 et 3D7.
Complexity of the genotypes of FC27 and 3D7 types.

âge (années)	génotypes 3D7				génotypes FC27				génotypes 3D7 + FC27			
	cas graves	PGAS	PGSAS	PNG	cas graves	PGAS	PGSAS	PNG	cas graves	PGAS	PGSAS	PNG
< 1 an	1,2	1,1	1,2	1,4	1,8	1,8	1,6	1,1	3,0	3,0	2,8	2,5
1 an	1,3	1,0	1,5	1,3	1,9	1,9	1,8	1,2	3,2	2,9	3,4	2,5
2-5 ans	1,1	0,9	1,2	1,2	1,4	1,6	1,4	1,2	2,6	2,6	2,6	2,4
0,5-5 ans	1,2	1,0	1,3	1,3	1,7	1,8	1,6	1,2	2,9	2,9	2,9	2,5
valeur de p	0,2	0,4	0,1	0,7	0,06	0,6	0,3	0,9	0,08	0,7	0,05	0,9
comparaisons statistiques (valeur de p)												
PGSAS vs PNG	p = 0,3				p << 0,001				p = 0,002			
PGAS vs PNG	p = 0,1				p << 0,001				p = 0,02			
PGAS vs PGSAS	p = 0,04				p < 0,04				p = 0,6			
cas graves vs PNG	p = 0,5				p << 0,001				p = 0,004			

Selon les entités cliniques, la polyclonalité était de 78,5 % (70,5-86,5) chez les PGAS, 85 % (78,2-91,8) chez les PGSAS et 77 % (71,1-82,9) chez les PNG (figure 1); les différences observées ne sont pas statistiquement significatives.

Discussion

Dans cette étude, nous n'avons pas noté de différence dans la fréquence de la famille FC27 entre les trois entités cliniques. Ces résultats corroborent ceux de nombreuses autres études réalisées au Sénégal (29) ou au Gabon (21). Cependant, nos résultats s'opposent à ceux d'ENGELBRECHT *et al.* (8), qui ont trouvé, en Papouasie - Nouvelle-Guinée, une fréquence plus élevée de la famille FC27 chez des malades que chez des sujets asymptomatiques. Le constat d'une fréquence plus élevée des génotypes FC27 chez les malades a été aussi décrit par MARSHALL *et al.* (17) et FELGER *et al.* (12) en 1994; alors que NTOUMI *et al.* (20) notaient en 1995 une fréquence élevée de génotypes FC27 plutôt chez des porteurs asymptomatiques dans une région holoendémique de Dakar.

Par ailleurs, l'analyse de nos résultats a révélé que la fréquence des formes parasitaires 3D7 n'était pas différente entre cas graves et cas non graves. Cela confirme les résultats obtenus à Dakar entre les cas de paludisme grave et les cas non graves (25). Cette observation diffère des constats faits au Gabon, où il a été mis en évidence une fréquence plus élevée de la famille allélique 3D7 dans les infections aussi bien asymptomatiques que symptomatiques. Cependant, une prédominance des génotypes 3D7 a été notée dans notre étude dans les cas graves sans anémie sévère lorsqu'ils sont comparés aux cas graves avec anémie sévère. Ainsi, il y a une association statistiquement significative entre la présence de la famille allélique 3D7 et l'atténuation de la sévérité de l'anémie palustre.

Nous n'avons pas noté de corrélation significative entre l'âge des patients et la fréquence des familles alléliques FC27 et 3D7 quelle que soit l'entité clinique. D'ailleurs, de nombreuses études effectuées notamment en zone endémique ont fait le même constat (11, 27).

La complexité reflétant au niveau individuel la relation hôte-parasite, nous n'avons pas noté de variation significative avec l'âge en ce qui concerne la complexité des génotypes dans notre étude quelque soit l'état clinique du patient. Un constat similaire a été fait au Bénin (15) et au Ghana (18), alors que des variations significatives de la complexité des génotypes de *P. falciparum* avec l'âge ont été observées par NTOUMI *et al.* (20), qui rapportaient dans une étude réalisée en 1995 au Sénégal que de quatre génotypes de *P. falciparum* en moyenne par individu chez des enfants de 0 à 14 ans, la complexité passait à deux génotypes chez les sujets âgés. Nous n'avons pas pu observer une telle réduction dans notre étude, probablement parce que les enfants de notre étude avaient moins de 5 ans. Dans notre étude, la complexité des génotypes FC27 est statistiquement plus élevée dans les cas graves d'une manière générale que dans les cas non graves. Le nombre élevé de génotypes de type FC27 semble être donc associé à la gravité du paludisme. Cette conclusion est intéressante à relever car elle vient renforcer celles de BECK *et al.* (4), ENGELBRECHT *et al.* (8) et celles de FELGER *et al.* (10), qui ont indiqué que les génotypes parasitaires de type FC27 sont associés à un risque accru de paludisme grave. Par contre, le nombre moyen de génotypes 3D7 n'était pas différent entre cas graves et cas non graves, mais nous avons plutôt constaté une complexité des génotypes 3D7 plus élevée dans les cas graves sans anémie sévère comparés aux cas graves avec anémie sévère. Cette dernière observation conforte une fois de plus l'hypothèse

selon laquelle les souches 3D7 protégeraient contre la sévérité de l'anémie. Par ailleurs, la valeur de complexité obtenue dans les cas non graves serait proche de celle obtenue par FELGER *et al.* (11) en Tanzanie.

En analysant la complexité moyenne de l'ensemble des génotypes parasitaires, c'est-à-dire 3D7 et FC27 confondus, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre les entités cliniques de notre étude, contrairement à MOCKENHAUPT *et al.* (18) qui ont constaté qu'une complexité élevée contribuerait à la sévérité de l'anémie palustre. Les valeurs de complexité trouvées respectivement dans les cas graves avec anémie sévère et sans anémie sévère sont supérieures aux valeurs obtenues par ROBERT *et al.* (25) au Sénégal, respectivement $2,9 \pm 1,6$ et $2,9 \pm 1,4$ dans notre étude contre 2,4 et 2,3.

Une complexité d'ensemble (3D7+FC27) de 2,4 (similaire à la valeur obtenue dans notre étude dans les cas non graves) a été rapportée par FELGER *et al.* (11). Des valeurs de complexité de 5 et 4,5 (plus élevées que les nôtres) ont été en outre retrouvées dans des cas non graves par BECK *et al.* (4) en Tanzanie et ENGELBRECHT *et al.* (9) au Nigéria. Ces différences seraient liées au niveau de transmission plus élevé dans ces zones comparé à celui de notre zone d'étude.

Dans notre étude, le nombre de génotypes de *P. falciparum* varie de 0 à 8 par personne (figure 1). L'absence de différence dans la fréquence des infections multiples dans notre étude entre les entités cliniques pourrait s'expliquer par le niveau d'endémicité élevé lié à un taux d'inoculation assez élevé. Par ailleurs, il est à noter que 44,2 % des cas graves avec anémie sévère, 52,4 % des cas graves sans anémie sévère et 59,2 % des cas non graves hébergeaient deux ou trois génotypes différents de *P. falciparum*. Ce fait témoigne d'une polyclonalité élevée.

La présence élevée d'infections multiples constatées dans notre étude a été aussi décrite par SMITH *et al.* (27), qui ont rapporté en Tanzanie jusqu'à 5 génotypes différents de *P. falciparum* par personne. En 2000, ENGELBRECHT *et al.* (9) avaient noté au Nord du Nigeria, chez des sujets asymptomatiques, une polyclonalité d'environ 80 %, proche des 77 % de notre étude. Cette fréquence élevée de génotypes multiples de *P. falciparum* en Afrique sub-saharienne contraste avec des études effectuées en Papouasie - Nouvelle-Guinée, où FELGER *et al.* (12), ENGELBRECHT *et al.* (8) ont noté seulement un génotype par personne, rarement deux. Cette faible fréquence de génotypes multiples s'expliquerait par le bas niveau de transmission du paludisme dans cette région (9).

Conclusion

Cette étude sur le polymorphisme allélique de *P. falciparum* a permis de comparer non seulement la fréquence des familles alléliques FC27 et 3D7 de *P. falciparum*, mais aussi la complexité des génotypes et la polyclonalité de l'infection entre les trois entités cliniques. Ces résultats devront permettre de mieux comprendre la relation entre les aspects cliniques du paludisme et la diversité génétique des parasites qui sont impliqués dans les manifestations cliniques.

Remerciements

Nos sincères remerciements vont au personnel du CHR de Tenkodogo (notamment à celui du service de pédiatrie) et aux habitants des villages de Gourganbaga et Zano.

Cette étude a bénéficié d'un financement de MIM/OMS/TDR.

Références bibliographiques

- AL-YAMAN F, GENTON B, MOKELA D, RAIKO A, KATI S et al. – Human cerebral malaria: lack and significant association between erythrocyte resetting and disease severity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995, 89, 55-58.
- AL-YAMAN F, GENTON B, REEDER JC, ANDERS RF, SMITH T & ALPERS MP – Reduced risk of clinical malaria in children infected with multiple clones of *P. falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1997, 91, 602-605.
- BABIKER HA, LINES J, HILL WG & WALLIKER D – Population structure of *Plasmodium falciparum* in village with different malaria endemicity in east Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 56, 141-147.
- BECK H-P, FELGER I, VOUNATSOU R, HIRT R, TANNER M et al. – Effect of iron supplementation and malaria prophylaxis in infants on *P. falciparum* genotype and multiplicity of the infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, 93, S1/41-45.
- CARLSON J, HELMBY H, HILLA, BREWSTER D, GREENWOOD B & WAHLGREN M – Human cerebral malaria: association with erythrocyte resetting and lack of anti-resetting antibodies. *Lancet*, 1990, 336, 1457-1460.
- CLOUGH B, ATILOLA FA & PASVOL G – The role of resetting in the multiplication of *Plasmodium falciparum*: rosette formation neither enhances nor targets parasite invasion into uninfected red cells. *British Journal of haematology*, 1998, 100, 99-104.
- CREASEY A, FENTON B, WALKER A et al. – Genetic diversity of *P. falciparum* shows geographical variation. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, 42, 403-413.
- ENGELBRECHT F, FELGER I, GENTON B, ALPERS M & BECK HP – *Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Experimental Parasitology*, 1995, 81, 90-96.
- ENGELBRECHT F, TÖGEL E, BECK H-P, ENWEZOR F, OETTLI A & FELGER I – Analysis of *P. falciparum* infections in a village community in Northern Nigeria: determination of msp2 genotypes and parasites-specific IgG responses. *Acta Tropica*, 2000, 74, 63-71.
- FELGER I, HUBERT W, STEIGER S, SMITH T, WEISS N et al. – Multiplicity of *P. falciparum*. High multiplicity of *P. falciparum* is associated with reduced risk of clinical malaria in Tanzanian children. (Article non publié). 1996, 18 p.
- FELGER I, SMITH T, EDOH D, KITUA A, ALONSO P et al. – Multiple *Plasmodium falciparum* infection in Tanzanian infants. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, 93, S1/29-34.
- FELGER I, TAVUL L, KABINTIK S, MARSHALL V, GENTON B et al. – *Plasmodium falciparum*: extensive polymorphism in merozoite surface protein 2 alleles in an area with endemic malaria in Papua New Guinea. *Experimental Parasitology*, 1994, 79, 106-116.
- GUPTA S, HILL A, KWIATKOWSKI D, GREENWOOD M, GREENWOOD B & DAY K – Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1994, 91, 3715-3719.
- GUSTINCICH S et al. – A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. *Biotechniques*, 1991, 11, 298-302.
- ISSIFOU S, DIJKOU S, SANNA A, LEKOULOU F & NTOUMI F – Pas d'influence de la saison de transmission ni de l'âge des patients sur la complexité et la diversité génétique des infections dues à *Plasmodium falciparum* à Cotonou (Bénin). *Bull Soc Pathol Exot*, 2001, 94, 195-198.
- MAJORI G, SABATINELLI G & COLUZZI M – Efficacy of permethrin impregnated curtains for malaria vector control. *Med Vet Entomol*, 1987, 1, 185-192.
- MARSHALL VM, ANTHONY RL, BANGS PURNOMO MJ, ANDERS RF & COPPEL RL – Allelic variants of *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2 (msp-2) in geographically restricted area of Irian Jaya. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1994, 63, 13-21.
- MOCKENHAUPT FP, EHRHARDT S, EGGELTE TA, MARKERT M, ANEMANA S et al. – *Plasmodium falciparum* multiplicity correlate with anaemia in symptomatic malaria. *Tropical Medicine and International Health*, 2003, 8, 857-859.
- MODIANO D, SIRIMA BS, SAWADOGO A, SANOU I, PARE J et al. – Severe malaria in Burkina Faso: Influence of age and transmission level on clinical presentation. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, 59, S39-S42.
- NTOUMI F, CONTAMIN H, ROGIER C, BONNEFOY S, TRAPE JF & MERCEREAU PUIJALON O – Age dependent carriage of multiple *P. falciparum* merozoite surface protein-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, 52, 81-88.
- NTOUMI F, NGOUNDOU-LANDJI J, LUTY AJF, DUBREUIL G & MILLET P – Polymorphisme allélique du gène msp2 de *Plasmodium falciparum* analysé à partir d'échantillons sanguins d'enfants gabonais. *Bull Soc Pathol Exot*, 2001, 94, 183-187.
- OMS – Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2000, 94, 1-90.
- PETRARCA V, PETRANGELI G, ROSSI P & SABATINELLI G – Antimalarial campaign program in Ouagadougou (Burkina Faso): the *Anopheles gambiae* complex in the city of Ouagadougou and surrounding villages. *Ann Ist Super Sanita*, 1996, 22, 189-191.
- RINGWALD P, PEYRON F, LEPERS J-P, RABARISON P, RAKOTOMALALA C et al. – Parasite virulence factors during falciparum malaria: rosetting, cytoadherence by cytokines. *Infection and immunity*, 1993, 61, S198-S204.
- ROBERT F, NTOUMI F, ANGEL G, CANDITO C, ROGIER C et al. – Extensive genetic diversity of *P. falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, 90, 704-711.
- ROWE A, OBEIRO J, NEWBOLD C & MARSH K – *Plasmodium falciparum* resetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infections and immunity*, 1995, 63, 2323-2326.
- SMITH T, FELGER I, EDOH D, KITUA A, TANNER M & BECK HP – Dynamics of multiple *P. falciparum* infections in infants in a highly endemic area of Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, 93, S1/35-39.
- VIRIYAKOSOL S, SIRIPOON N, PETCHARAPIRAT C, PETCHARAPIRAT P, JARRA W et al. – Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies. *Bull Organ Mond Santé*, 1995, 73, 85-95.
- ZWETUYENGA J, ROGIER C, TALL A, FONTENILLE D, SNOU-NOU G et al. – No influence of age on infection complexity an allelic distribution in *P. falciparum* infection in Ndiop, a Senegalese village with seasonal mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, 59, 726-735.

Annexe 4 : Article sur la diversité génétique en fonction du milieu : urbain et rural

Malaria Journal



Research

Open Access

***Plasmodium falciparum* genotypes diversity in symptomatic malaria of children living in an urban and a rural setting in Burkina Faso**

Issiaka Soulama¹, Issa Nébié¹, Alphonse Ouédraogo¹, Adama Gansane¹, Amidou Diarra¹, Alfred B Tiono¹, Edith C Bougouma¹, Amadou T Konaté¹, Gustave B Kabré⁵, Walter RJ Taylor^{2,3} and Sodiomon B Sirima*^{1,4}

Address: ¹Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme, 01 BP 2208 Ouagadougou 01, Burkina Faso, ²Travel and Migration Medicine Unit, Geneva University Hospital, Geneva, Switzerland, ³Oxford University Clinical Research Unit, Hanoi, Vietnam, ⁴Groupe de Recherche et d'Action en Santé, Ouagadougou, Burkina Faso and ⁵Université de Ouagadougou, Unité de Formation et de Recherche Science de la Vie et de la Terre, Ouagadougou, Burkina Faso

Email: Issiaka Soulama - a.soulama.cnrfp@fasonet.bf; Issa Nébié - issanebie.cnlp@fasonet.bf; Alphonse Ouédraogo - aouedraogo.cnrfp@fasonet.bf; Adama Gansane - agansane.cnrfp@fasonet.bf; Amidou Diarra - a.diarra.cnrfp@fasonet.bf; Alfred B Tiono - t.alfred@fasonet.bf; Edith C Bougouma - eddy.cnrfp@fasonet.bf; Amadou T Konaté - a.konate.cnlp@fasonet.bf; Gustave B Kabré - gkabre@univ-ouaga.bf; Walter RJ Taylor - btaylor@oucru.org; Sodiomon B Sirima* - s.sirima.cnlp@fasonet.bf

* Corresponding author

Published: 20 June 2009

Received: 24 January 2009

Malaria Journal 2009, 8:135 doi:10.1186/1475-2875-8-135

Accepted: 20 June 2009

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/8/1/135>

© 2009 Soulama et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The clinical presentation of malaria, considered as the result of a complex interaction between parasite and human genetics, is described to be different between rural and urban areas. The analysis of the *Plasmodium falciparum* genetic diversity in children with uncomplicated malaria, living in these two different areas, may help to understand the effect of urbanization on the distribution of *P. falciparum* genotypes.

Methods: Isolates collected from 75 and 89 children with uncomplicated malaria infection living in a rural and an urban area of Burkina Faso, respectively, were analysed by a nested PCR amplification of *msp1* and *msp2* genes to compare *P. falciparum* diversity.

Results: The KI allelic family was widespread in children living in the two sites, compared to other *msp1* allelic families (frequency >90%). The MAD 20 allelic family of *msp1* was more prevalent ($p = 0.0001$) in the urban (85.3%) than the rural area (63.2%). In the urban area, the 3D7 alleles of *msp2* were more prevalent compared to FC27 alleles, with a high frequency for the 3D7 300_{bp} allele (>30%). The multiplicity of infection was in the range of one to six in the urban area and of one to seven in the rural area. There was no difference in the frequency of multiple infections ($p = 0.6$): 96.0% (95% C.I: 91.6–100) in urban versus 93.1% (95% C.I: 87.6–98.6) in rural areas. The complexity of infection increased with age [$p = 0.04$ (rural area), $p = 0.06$ (urban area)].

Conclusion: Urban-rural area differences were observed in some allelic families (MAD20, FC27, 3D7), suggesting a probable impact of urbanization on genetic variability of *P. falciparum*. This should be taken into account in the implementation of malaria control measures.

Background

According to demographic [1] and entomological [2] data, urbanization itself can reduce malaria transmission and increase the number of non-immune individuals, leading to differences in the features of rural and urban malaria. Previous epidemiological studies carried out in malaria-endemic areas highlighted the predominance of cerebral symptoms of severe malaria in low transmission urban area, while in high transmission rural area severe anaemia was the main clinical feature of severe malaria [3].

The relationship between parasites genotypes and clinical outcome has been reported in several studies [4-6]. The influence of the urbanization on transmission level and consequently on the clinical outcome, may affect the allelic polymorphism of *Plasmodium falciparum* and the distribution of parasite genotypes between urban and rural areas. A better understanding of the rural-urban dynamics of *P. falciparum* genotypes may be an important element for implementing malaria control strategies in the sub-Saharan Africa.

The present study examined and compared the genetic diversity of *P. falciparum* in infected children living in two different areas, rural and urban, in Burkina Faso using two highly polymorphic genes encoding the merozoite surface protein-1 (MSP-1) and the merozoite surface protein-2 (MSP-2) [7,8].

Methods

Study sites

The study was carried out in 2003 in the Health district of Pissy in Ouagadougou, the capital of Burkina Faso, and in Balonghin, a village in the Saponé Health district. The Pissy Health district is one of the four urban Health districts of the Ouagadougou city located at the west part of the city. The Pissy Health district catchments area is inhabited by about 638,234 inhabitants. According to the National Statistic and Demography Institute report, the literacy rate in Ouagadougou city was about 63% in 2003 [9]. The Saponé Health district is located in the centre-south region at about 50 kilometres south of Ouagadougou. This district is one of fifty rural districts of the country. The population size of Saponé health district was estimated at 105,157 inhabitants with a regional literacy rate at about 15.9% [9].

In the Balonghin rural area, houses are mainly constructed out of local materials with mud block and roofed with the same material. Some mud block houses were roofed with iron-sheet as well as grass. The Pissy urban area was mainly characterized by housing unit built with manufactured material (cement) and roofed with iron-sheet.

Malaria transmission is perennial in both districts with a peak during the rains season (from May to October). The entomological inoculation rate (EIR) was estimated at < 10 infected bites/person/year in Ouagadougou [10] and 200 infected/bites/person/year in Balonghin area [11]. In 2003, the prevalence rate in children of less than five years of age, presenting with clinical malaria, was estimated at 37.6% and 43.9%, in Pissy and Saponé health district, respectively [12].

Patient enrolment

The study was part of studies assessing anti-malarial drug efficacy that were performed from July to December 2003 at both sites. Patients were enrolled in accordance with the World Health Organization (WHO) protocol for anti-malarial assessment [13], but slightly modified. The inclusion criteria included: 1) age between six and 59 months; 2) fever (axillary temperature = 37.5°C) or a history of fever within the past 48 hours; 3) *P. falciparum* mono-infection with parasite density between 1,000 and 150,000 asexual forms per microlitre, identified microscopically on blood smears; 4) no history of anti-malarial drug administration in the last two weeks; 5) no history of serious adverse effects to the study drugs (chloroquine and sulphadoxine-pyrimethamine); 6) no evidence of a concomitant febrile illness; 7) no sign/symptoms of severe malaria as defined by WHO [14].

Informed consent was obtained from parents or legal guardians of children prior to their enrolment. At the time of the study, there was no Ethical Committee in Burkina Faso; therefore, the study protocol was reviewed and approved by The Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme of the Ministry of Health of Burkina Faso.

Blood spots were collected on filter paper from all children fulfilling the above criteria. Thick and thin blood films were prepared and read in the standard way; the number of parasites per microlitre of blood was calculated assuming an average of 8,000 white blood cell/ μ l of blood. For the internal quality control, 10% of all slides were re-read by an experienced independent microscopist.

Blood spots samples and parasite DNA extraction

Blood from a finger prick spotted onto Whatman filter Paper #1, labelled with patients' study numbers, air-dried, and individually placed into plastic bag marked with the patients' initials. The bags were stored at room temperature. Parasite DNA was extracted using Chelex methods [15]. Briefly, 50 μ l of 20% Chelex 100 solution (Bio-Rad Laboratories) was added to 1.5 ml microcentrifuge tube containing fragments of filter paper sample. Then, 100 μ l of sterile water were added and the microcentrifuge tube placed onto a heating block at 95–100°C for 10 minutes

of incubation. During the incubation phase, the tube was gently whirled and returned to the heat block every two minutes. The samples were centrifuged twice and the final supernatant was conserved in a new, labelled tube and stored at -20°C until it was used for the amplification reaction.

PCR amplification of the *P. falciparum* *msp1* and *msp2* genes

Two polymorphic loci, *msp1* and *msp2*, were used for the genotyping of the parasite population in this study. The regions of *msp1* and *msp2*, which vary in repeat number and in adjacent sequence type, with three (Mad20, K1, RO33) and two (FC27, 3D7) allelic families [16], were analysed by a nested PCR amplification. For the primary amplifications, outer primer pairs corresponding to the flanking sequence of the conserved regions of *msp1* and *msp2* were used. The second amplification reactions were based on the primary products using allelic-specific primers sets corresponding to K1, RO33 and Mad20 families of *msp1* and FC27, 3D7 families of *msp2*.

The following oligonucleotide primers sequences were used:

msp2-1 outer (ATG AAG GTA ATT AAA ACA TTG TCT ATT ATA); *msp2-4* outer (ATA TGG CAA AAG ATA AAA CAA GTG TTG CTG); *msp1-A* outer (AAG CTT TAG AAG ATG CAG TAT TGA C); *msp1-B* outer (ATT CAT TAA TTT CIT CAT ATC CAT C); *FC27-A* (GCA AAT GAA GGT TCT AAT ACT AAT AG); *FC27-B* (GCT TTG GGT CCT TCT TCA GTT GAT TC); *3D7-A* (GCA GAA AGT AAG CCT TCT ACT GGT GCT); *3D7-B* (GAT TTG TTT CGG CAT TAT TAT GA); *K1-A* (AAG AAA TTA CTA CAA AAG GTG CAA GTG); *K1-B* (AGA TGA AGT ATT TGA ACG AGG TAA AGT G); *RO33-A* (AGG ATT TGC AGC ACC TGG AGA TCT); *RO33-B* (GAG CAA ATA CTC AAG TTG TTG CAA AGC); *MA20-A* (TGA ATT ATC TGA AGG ATT TGT ACG TCT TGA); *MAD 20-B* (GAA CAA GTC GAA CAG CTG TTA)

Primary amplifications reactions were carried out using 5 µl of DNA extracted solution and the nested PCR used 2 µl of the first PCR product. For each reaction, 200 µM each of dNTP, 1 µM of each primer, 0.5 UI of *Taq* DNA polymerase (Sigma Aldrich Chemie GMBH, Deutschland) and PCR Buffer 10× containing 100 mM Tris-HCl, pH 8.3 at 25°C; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; and 0.01% gelatine, were used in a final volume of 20 µl. First and nested amplifications were performed on a PELTIER PTC Thermocycler 100. The cycle condition for *msp1* and *msp2* outer PCR (30 cycles) were: denaturation at 94°C for 5 min, annealing at 55°C for 1 min 30 sec, extension at 72°C for 2 min and final extension for 10 min to insure that all product were full-length. For the inner PCR similar conditions were used for the denaturing and extension

but the annealing condition were specific for each primer as described: FC27 and 3D7 were annealing at 57°C, K1 and MAD20 were annealing at 62°C, RO33 annealing temperature was 58°C. The specific amplifications in *msp1* group were performed for 25 cycles while for *msp2* group the reaction were 30 cycles.

The amplified PCR products were either stored at +4°C or analysed immediately by electrophoresis on a 1.5% agarose gel (Sigma Aldrich Chemie GMBH, Deutschland). The sizes of the PCR products were estimated using 100 base pairs (bp) DNA ladder marker (Sigma Aldrich Chemie GMBH). The *msp1* and *msp2* alleles were categorized by their molecular weights and considered the same if their molecular weights were approximately within 10 bp.

Definitions

The detection of a single PCR fragment for each locus was classified as an infection with one parasite genotype. The detection of more than one PCR fragment for either *msp1* or *msp2* loci (i.e. an infection with more than one parasite genotype) defined as a multiple *P. falciparum* infection. The number of patients with more than one parasite genotype within the total infected population is defined as the frequency of multiple infections. The complexity was defined as the mean number of parasite genotypes per infected patient [17]. The complexity of infection and the frequency of multiple infections were calculated by combining the *msp1* and *msp2* PCR genotyping results. The highest number of bands detected, whatever the locus, was used to calculate the value for the overall complexity of infection.

Statistical analysis

The DNA fragments from the electrophoresis were assigned to specific allelic families according to the second PCR results. The data were double entered and were analysed using Epi info Version 6.04. The proportions comparison was made by Chi squared and normally distributed continuous data by the Student's t test and ANOVA.

Results

Characteristics of the study population

A total of 164 filter blots samples were obtained; 75 and 89 from rural and urban dwellers, respectively. The mean age of the study participants from the two sites was similar ($p = 0.3$): 2.6 years [95% confidence interval (CI), 2.3–2.9] and 2.4 years [95% CI 1.4–3.4] in rural and urban area, respectively. The male to female ratios were 1.1 and 1.2 in Balonghin (rural) and Pissy (urban), respectively.

The nested PCR of *msp1* and *msp2* amplification were completed on all samples from the two groups. *Plasmodium falciparum* DNA amplification was successful for

msp1 and *msp2* in all 75 (100%) samples from Pissy, but of 89 samples from Balonghin, 87 (97.8%) and 73 (82.0%) samples were successfully amplified for *msp1* and for *msp2*, respectively.

Complexity and frequency of multiple infections

The numbers of different parasite genotypes found in infected children were ranged from one to seven in the rural area and from one to six in the urban area. The complexity of infection (Figure 1) did not show any statistical difference between the rural and urban areas ($p = 0.1$). However, there was a trend of increasing complexity with age in the rural area with a positive association ($p = 0.04$, t-test), but with a borderline statistical significance ($p = 0.06$, t-test) in the urban area (Figure 1). Based on the two genetic loci, the frequency of multiple infections was >90% in all children and there was no significant difference ($p = 0.3$) between rural 92.0 (86.3–97.7)% and urban 96.0 (92.0–100)% areas.

Prevalence of *msp1* and *msp2* allelic families

Of all the alleles analysed, the K1-type alleles were the most frequently detected in symptomatic malaria children living in both areas (Additional file 1). Overall, the frequencies of the K1 and RO33 type alleles showed no difference between symptomatic malaria children in the two areas while the Mad20-type alleles were significantly more

frequent in the urban area malaria children. Of the *msp2* alleles, the FC27 type alleles were more frequent in the rural symptomatic children, compared to those living in the urban area, and occurred at a higher frequency than the 3D7 type allele in the rural area. The 3D7 type alleles were more frequent in symptomatic malaria cases in the urban area compared to those from rural area (not statistically significant), but significantly more prevalent than the FC27 allele in the urban area.

Distribution of *msp1* and *msp2* alleles

All the *msp1* and *msp2* alleles were classified according to their size. Seventy individual *msp* alleles were identified in study children in the two sites (Figures 2 and 3): 16 different alleles for FC27 (150–900 bp); 13 for 3D7 (150–800 bp); 13 K1 type's alleles (100–500 bp); 11 alleles for RO33 (120–550 bp) and 17 Mad20 types alleles (100–600 bp).

The sizes of all the FC27 type alleles from children living in the urban area were between 280 and 900 bp while in rural area there were few children with alleles above 550 bp (Figure 2); overall, fragments of the 400 bp allele predominated in children from the both areas: 35% in infected children from the urban and 40% in children from the rural area. The FC27 350_{bp} allele was more prevalent in malaria infected children from rural than those

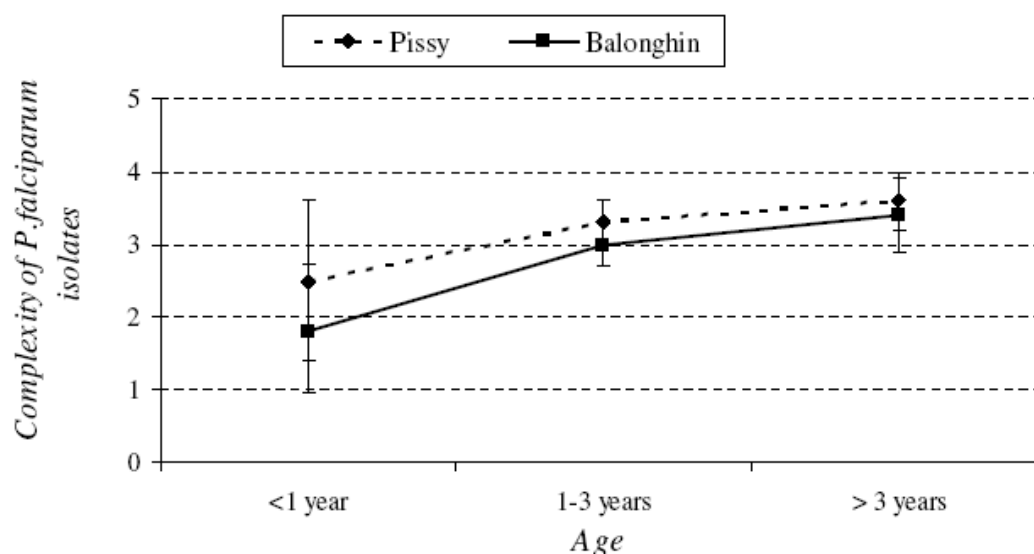


Figure 1
Mean number (complexity) of *Plasmodium falciparum* genotypes among children from Balonghin (rural area) and Pissy (urban area). p -value (t-test in rural area) = 0.04; p -value (t-test in urban area) = 0.06.

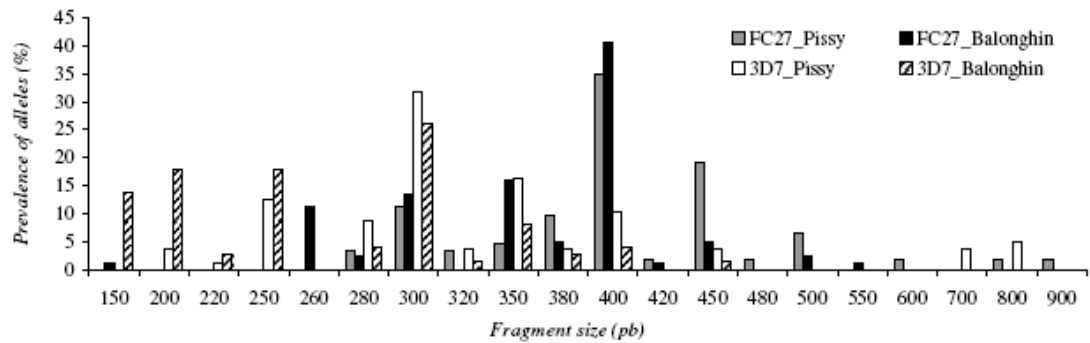


Figure 2: Prevalence of *P. falciparum* FC27 and 3D7 *msp2* alleles classified by length (in base pairs) in rural and urban area

Figure 2
Prevalence of *P. falciparum* FC27 and 3D7 *msp2* alleles classified by length (in base pairs) in rural and urban area.

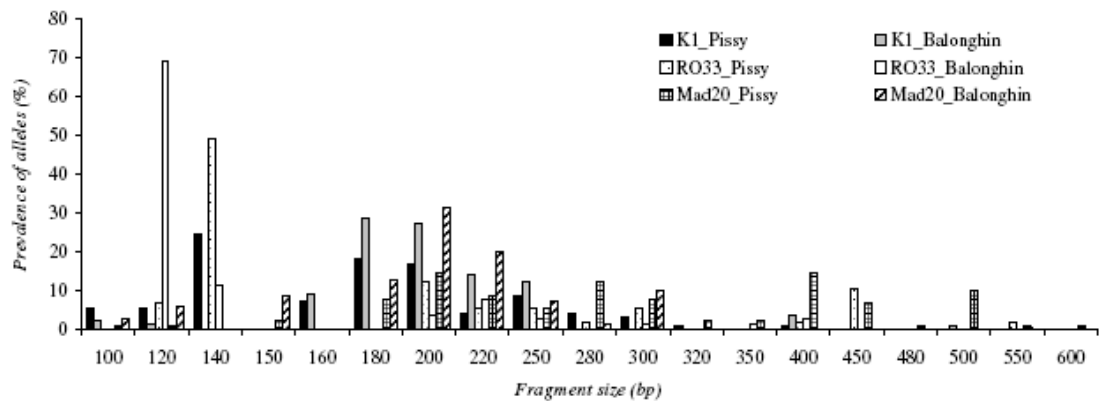


Figure 3: Prevalence of *P. falciparum* K1, RO33 and Mad20 *msp1* alleles classified by length (in base pairs) in rural and urban area

Figure 3
Prevalence of *P. falciparum* K1, RO33 and Mad20 *msp1* alleles classified by length (in base pairs) in rural and urban area.

from the urban area ($p = 0.02$) while FC27 450_{bp} was more prevalent in urban symptomatic children than in rural children ($p = 0.02$). The most prevalent infecting 3D7 allele was the 3D7 300_{bp} in both areas [31.6% in urban and 26% in rural area (Figure 2)].

The analysis of K1 alleles revealed four prevalent alleles (180_{bp}, 200_{bp}, 220_{bp} and 250_{bp}) in the rural malaria infected patients versus two in the urban malaria infected patients (200 and 220_{bp}). The K1 140_{bp} allele was absent in children infected in rural area (Figure 3).

Of the RO33 alleles, the RO33_{120 bp} (69%) and RO33 140_{bp} (49%) were dominant in malaria-infected children in rural and urban areas, respectively. The Mad20 type alleles were more frequent in urban malaria infected children (17 different alleles) compared to rural area (nine different alleles) (Figure 3).

Discussion

The purpose of this study was to compare, using the two most polymorphic regions of *msp1* and *msp2* genes, the genetic diversity of *P. falciparum* in malaria symptomatic children living in two different settings, an urban and a rural area, characterized by markedly different transmission intensities.

Although all the *msp1* families (K1, Mad20 and RO33) were found in infected children from both areas, Mad 20 allelic family was found more frequent in infected children from urban area than those from rural area. But, some *msp1* alleles detected were differently distributed in children living in both sites. The K1 type alleles were the most representative's *msp1* alleles in malaria infected children living both in the rural and the urban areas, consistent with different studies conducted in Gabon [18,19], in Central Africa or in Honduras [20] in Central America. However, a high frequency of the K1 140_{bp} and RO33 140_{pb} alleles was observed in children in urban site compared to a high frequency of RO33 120_{pb} allele observed in those from rural area. These differences in urban rural symptomatic malaria children may suggest a specific immune response against this allele or a random event due to genetic drift [21].

The analysis of *msp2* families showed the FC27 was predominant in children from the rural area whilst in the urban area most of the children was infected by the 3D7 family parasites. When analysed the FC27 alleles, the FC27 350_{pb} was predominant in children from the rural area compared to the FC27 450_{pb} mainly observed in children infected the urban area. Differences in transmission level and anti-malarial immunity known to be strain specific [22], could partly explain the differences in the distribution of the different alleles. It was known that there was an

increase of the migration process from the rural area to the urban area (Ouagadougou) the past 10 years [23]. This demographic change in the urban area, as well as others factors, such as individual and household factors (e.g. the use of impregnated bed nets, indoor insecticide spraying), and climatic and topographical factors (e.g. humidity, rain fall, temperature, soil type, the presence of water reservoirs) may affect the level of malaria transmission and lead to a rural-urban difference in parasite genotypes carriage.

In a given locality, the parasite genetic pool may be relatively stable, perhaps related to the stable parasite life cycle; thus, the distribution of alleles may be determined randomly so that certain alleles will predominate by chance. Nevertheless, there are certain factors external to the natural life cycle that are known to affect allelic distribution, notably, anti-malarial drug pressure that is characteristically greater in urban areas and result in a higher prevalence of drug resistance markers [24], the proximity of populations to water reservoirs, as it has been observed in Pissy [25], the use of insecticide-treated nets or certain human genetic factors (haemoglobin types, G6PD), that could explain the difference in the distribution of *P. falciparum* genotypes between the two sites.

The study did not show a difference in the complexity of infections between rural and urban area (3.0 ± 1.3 vs 3.3 ± 1.1 genotypes respectively) infected children less than five years of age. The data on *P. falciparum* complexity in children living in rural area were comparable to those observed in the eastern rural area of Burkina [26]. However, the data analysis also showed that the complexity of infection in both sites increased with children age; this was significant in rural and of borderline significance in urban area. This suggests that younger children might still have protection from maternal antibodies or could simply mean a lower risk of multiple infections due to a lower exposure time at risk of infection. A comparable trend of a positive association between complexity and age was observed in previous study in a rural area of Burkina Faso [26], but Issifou *et al* [27] did not observe an age-dependent pattern in Benin. Other factors, such malaria transmission intensity or transmission season may probably affect the variation in the complexity of infection [28-30].

Conclusion

The paper demonstrated that there were some differences in the *P. falciparum* diversity between symptomatic children living in urban and rural areas and this should be taken into account when designing MSP1 or MSP2 malaria vaccine. The study also emphasizes the importance of evaluating the extent of parasite genetic variation and the factors affecting this variation. In this context, longitudinal studies examining the dynamics of the *P. falciparum*

parum genetic diversity, including genes conferring drug resistance, between urban and rural areas, could have public health implications for malaria control.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

IS, IN and GK participated to study design, data collection, local supervision, statistical analysis, data interpretation and manuscript preparation. AO, AG, AD, AT, ECB, and AK participated to study design, data collection and local supervision. WT participated in revision of the manuscript. SS participated in the design of the study, acquisition of funding, statistical analysis data interpretation, coordination and writing of the manuscript.

Additional material

Additional file 1

Table 1. *msp1* and *msp2* families' distribution according to urban and rural area.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1475-2875-8-135-S1.pdf>]

Acknowledgements

We thank are grateful to the children and their parents from Balonghin and Pissy for their participation to this study. We also thank the staff of CNRFP for his technical contribution. This investigation received financial support from African Malaria Network Trust (AMANET) and RBM/WHO Representative in Burkina Faso.

This study was performed in accordance to ethical and regulator laws in Burkina Faso

References

- Keiser J, Utzinger J, Caldas de Castro M, Smith TA, Tanner M, Singer BH: **Urbanization in sub-saharan Africa and implication for malaria control.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **71**:118-127.
- Robert V, Macintyre K, Keating J, Trape JF, Duchemin JB, Warren M, Beier JC: **Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 2003, **68**:169-176.
- Modiano D, Sirima BS, Sawadogo A, Sanou I, Pare J, Konate A, Pagnoni F: **Severe malaria in Burkina Faso: urban and rural environment.** *Parassitologia* 1999, **41**:251-254.
- Ariey F, Hommel D, Le Scanf C, Duchemin JB, Peneau C, Hulin A, Sarthou JL, Reynes JM, Fandeur T, Mercereau-Puijalon O: **Association of severe malaria with a specific *Plasmodium falciparum* genotype in French Guiana.** *J Infect Dis* 2001, **184**:237-241.
- Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M: **Molecular aspects of severe malaria.** *Clin Microbiol Rev* 2000, **13**:439-450.
- Gupta S, Hill AV, Kwiatkowski D, Greenwood AM, Greenwood BM, Day KP: **Parasite virulence and disease patterns in *Plasmodium falciparum* malaria.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:3715-3719.
- Farnert A, Snounou G, Rooth I, Bjorkman A: **Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area.** *Am J Trop Med Hyg* 1997, **56**:538-547.
- Viriyakosol S, Siripoon N, Petcharapirat C, Petcharapirat P, Jarra W, Thaitong S, Brown KN, Snounou G: **Genotyping of *Plasmodium falciparum* isolates by the polymerase chain reaction and potential uses in epidemiological studies.** *Bull World Health Organ* 1995, **73**:85-95.
- INSD: **Annuaire Statistique Edition 2008.** Burkina Faso 2009:413.
- Esposito F, Lombardi S, Modiano D, Zavala F, Reeme J, Lamizana L, Coluzzi M, Nussenzweig RS: **Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988, **82**:827-832.
- Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, Soulama I, Bougouma EC, Tiono AB, Konate AT, Chilengi R, Theisen M, Dodoo D, Remarque E, Bosomprah J, Milligan P, Sirima BS: **Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa.** *Infect Immun* 2008, **76**:759-766.
- Sirima BS, Soulama I, Tiono AB, Konate AT: **Données de base pour le suivi et l'évaluation de l'initiative "Faire reculer le Paludisme" et "Situation de la mise en oeuvre de l'initiative "Faire Reculer le Paludisme" dans les zones pilotes.** Ouagadougou: Programme National de Lutte contre le Paludisme; 2003:72.
- WHO: **Monitoring antimalarial drug resistance.** Geneva: WHO; 2002.
- WHO: **Severe *falciparum* malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94**:90.
- Plowe CV, Djimde A, Bouare M, Doumbo O, Welles TE: **Pyrimethamine and proguanil resistance-conferring mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa.** *Am J Trop Med Hyg* 1995, **52**:565-568.
- Ranford-Cartwright LC, Balfe P, Carter R, Walliker D: **Frequency of cross-fertilization in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*.** *Parasitology* 1993, **107**:11-18.
- Peyerl-Hoffmann G, Jelinek T, Kilian A, Kabagambe G, Metzger WG, von Sonnenburg F: **Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* and its relationship to parasite density in an area with different malaria endemicities in West Uganda.** *Trop Med Int Health* 2001, **6**:607-613.
- Aubouy A, Bakary M, Keundjian A, Mbomat B, Makita JR, Migot-Nabias F, Cot M, Le Bras J, Deloron P: **Combination of drug level measurement and parasite genotyping data for improved assessment of amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine efficacies in treating *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese children.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:231-237.
- Missinou MA, Kun JF, Lell B, Kremsner PG: **Change in *Plasmodium falciparum* genotype during successive malaria episodes in Gabonese children.** *Parasitol Res* 2001, **87**:1020-1023.
- Haddad D, Snounou G, Mattei D, Enamorado IG, Figueroa J, Stahl S, Berzins K: **Limited genetic diversity of *Plasmodium falciparum* in field isolates from Honduras.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **60**:30-34.
- Bogreau H, Renaud F, Bouchiba H, Durand P, Assi S, Henry M, Garnotel E, Pradines B, Fusai T, Wade B, Adehossi E, Parola P, Kamil MA, Puijalon O, Rogier C: **Genetic diversity and structure of african *Plasmodium falciparum* populations in urban and rural areas.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **74**:953-959.
- Magesa SM, Mdira KY, Babiker HA, Alifrangis M, Farnert A, Simonsen PE, Bygbjerg IC, Walliker D, Jakobsen PH: **Diversity of *Plasmodium falciparum* clones infecting children living in a holoendemic area in north-eastern Tanzania.** *Acta Trop* 2002, **84**:83-92.
- Ministère HU: **Habitat et Urbanisme au Burkina Faso. Rapport d'études** 2008:140.
- Meissner PE, Mandi G, Mockenhaupt FP, Witte S, Coulibaly B, Mansmann U, Frey C, Merkle H, Burhenne J, Walter-Sack I, Müller O: **Marked differences in the prevalence of chloroquine resistance between urban and rural communities in Burkina Faso.** *Acta Trop* 2008, **105**:81-86.
- Nebie I: **L'influence a long terme des rideaux impregnes d'insecticides sur l'immunité antipalustre chez des enfants vivant en zone rurale au Burkina Faso.** In *These unique de Doctorat Ouagadougou: Université de Ouagadougou*; 2002.

26. Soulama I, Sawadogo M, Nebie I, Diarra A, Tiono AB, Konate A, Sirima SB: **Genetic diversity of *P. falciparum* and pathogenesis of the severe malarial anaemia in children under 5 years old in the province of Boulgou, Burkina Faso.** *Bull Soc Pathol Exot* 2006, **99**:166-170.
27. Issifou S, Djikou S, Sanni A, Lekoulou F, Ntoumi F: **No influence of season of transmission nor age of patients on the complexity and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* infection in Cotonou, Benin.** *Bull Soc Pathol Exot* 2001, **94**:195-198.
28. Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O: **Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections.** *Am J Trop Med Hyg* 1995, **52**:81-88.
29. Roper C, Richardson WW, Elhassan IM, Giha H, Hviid L, Satti GM, Theander TG, Arnot DE: **Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village.** *Parasitology* 1998, **116**:501-510.
30. Smith T, Beck HP, Kicua A, Mwankusye S, Felger I, Fraser-Hurt N, Irion A, Alonso P, Teuscher T, Tanner M: **Age dependence of the multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and of other malariological indices in an area of high endemicity.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999, **93**:15-20.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Annexe 5 : Article sur la variation saisonnière de la diversité génétique

Low-high season variation in *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen 175 (*eba-175*) allelic forms in malaria endemic area of Burkina Faso

Issiaka Soulama¹, Edith C. Bougouma¹, Amidou Diarra¹, Issa Nebie¹ and Sodiomon B. Sirima^{1,2}

¹ Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP), Ouagadougou, Burkina Faso

² Groupe de Recherche et d'Action en Santé, Ouagadougou, Burkina Faso

Summary

OBJECTIVE To assess the impact of seasonal variation on the distribution of the *eba-175* allelic forms in the area where malaria transmission is markedly seasonal.

METHODS Blood samples were collected from 291 and 239 children under 5 years of age during the low and the high malaria transmission season, respectively, in four villages named Dawelgué, Kounda, Tanghin and Watenga of Saponé Health District, then screened for *eba* 175 F- and C- alleles by nested PCR analysis.

RESULTS F- alleles were more prevalent than C-alleles in the low [0.66 vs. 0.34 ($P < 0.0001$)] and high transmission season [0.67 vs. 0.33 ($P < 0.0001$)]. No significant seasonal variation was observed in the distribution of the two alleles. However, according to Sewall Wright rules, the population pairwise F_{ST} values, between Dawelgué and Tanghin during the low transmission season (F_{ST} value = 0.10415, P -value = 0.0090 and during the high season (F_{ST} value = 0.08244, P -value < 0.00001), between Tanghin and Watenga during the low season (F_{ST} value = 0.07414, P -value = 0.009) indicated a moderate but statistically significant genetic differentiation.

CONCLUSION Although there was a moderate but significant genetic differentiation between some study villages at different times of the year, this study result in the seasonal stability of *eba-175* allele's distribution in the study area.

keywords EBA-175 allelic forms, Burkina Faso

Introduction

Malaria constitutes a major public health concern throughout sub-Saharan Africa. Worldwide deaths due to malaria are currently estimated at approximately 881 000 per year, 90% of which occur in sub-Saharan Africa and antimalarial drug and insecticide resistance continues to be on the rise (WHO 2006, 2008). During the last two decades there have been considerable efforts to develop vaccines against malaria (Rogier *et al.* 2006). The complexity of the life cycle and the high polymorphism level displayed by the parasite has hindered progress in the development of a malaria vaccine in spite of a worldwide effort.

Invasion of the human erythrocyte by *Plasmodium* merozoites represents a complex and crucial stage in malaria parasite life cycle, and significantly impacts survival and host pathogenesis (Miller & Greenwood 2002). This step involves several specific interactions between receptors on the red blood cells (RBCs) and

parasite ligands. In the most virulent human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, only two invasion pathways have been well characterized, one involving Glycophorin A (GPA) and the 175 kDa Erythrocyte Binding Antigen (EBA-175) and a second pathway using glycophorin C (GPC) and a 140 kDa (EBA-140) also named BAEBL, a paralogue of EBA-175 (Camus 1985; Sim *et al.* 1994; Lobo *et al.* 2003; Maier *et al.* 2003). Other *P. falciparum* merozoites ligands involved in the erythrocytes invasion, like EBA-181 (also called JESEBL), PfNBP1, and PfNBP2b, have also been characterized (Duraisingh *et al.* 2003; Gilberger *et al.* 2003). However, little is known concerning the identity of the corresponding RBC receptors. The members of the erythrocyte binding-like (EBL) superfamily are highly diverse, providing the merozoite with high affinity binding ligands for a range of receptors on the surface of the erythrocyte (Adams *et al.* 2001). This genetic diversity likely explains why invasion of the erythrocyte by merozoite ligands appears to be strain-dependent (Hadley *et al.* 1987; Okoyeh *et al.* 1999).

I. Soulama *et al.* Seasonal variation EBA-175 allelic forms in Burkina Faso

The erythrocyte binding antigen-175 (*eba-175*) gene, located on chromosome seven, is one of the major genes in the Erythrocyte Binding Like (EBL) gene family that encodes for proteins which play a crucial role during erythrocyte invasion. The *eba-175* gene is comprised of four exons and seven regions termed I–VII including three cysteine-rich regions (F1, F2 and C) (Sim *et al.* 1990; Adams *et al.* 1992; Toure *et al.* 2006). Binding regions F1 and F2 located at the N-terminus of the molecule, exhibit low polymorphism. Conversely, region III, which is centrally located, is characterized by two dimorphic segments termed FCR3 and CAMP (Kain *et al.* 1993). This dimorphism results from different sized insertions located at slightly different positions in the region III (Ware *et al.* 1993). A single parasite clone may include one or the other segment but never both. This dimorphic region has been implicated in the invasion process (Kain *et al.* 1993), and previous studies have analysed the influence of this dimorphism on clinical disease and outcomes, as well as the distribution of the F and C genotypes in Africa (Cramer *et al.* 2004; Toure *et al.* 2006). As malaria epidemiology is known to differ between high and low transmission seasons (Molineaux & Gramiccia 1980; Luxemburger *et al.* 1996; Theander 1998), and based on some previous studies carried out in endemic area, demonstrating seasonal changes in malaria parasite population (Roper *et al.* 1998; Kobbe *et al.* 2006), we hypothesized that the distribution of the two allelic forms (CAMP and FCR3) of *eba-175* gene could be influenced by the season.

The objective of the present study was to assess the distribution of the F- and C-alleles in a malaria vaccine trial

site of Burkina Faso where malaria transmission is endemic and markedly seasonal.

Materials and methods

Study area and patients

This study is part of a larger epidemiology study with 1 year longitudinal follow up. During this period children involved in the study received care of free on charge at the community health facilities involved in the study. All uncomplicated malaria cases were freely managed using artemisinin-based combination therapy (COARTEN®). The study was carried out in 2007 in Dawelgué, Kounda, Tanghin and Watenga, four villages of the Saponé Health District, located approximately 50 km southwest of Ouagadougou, the capital city of Burkina Faso. The four study villages are located in the north-east part of the Saponé health district within an 8 km radius (Figure 1). The two farther villages (Kounda and Watenga) are about 11 km apart, while the two closest in distance (Dawelgué and Kounda) are 4 km (Figure 1). The population is about 540, 1720, 1332 and 480 inhabitants in Dawelgué, Kounda, Tanghin and Watenga, respectively. In all four villages the Mossi are the main ethnic group (> 95%). The estimated total population of children less than 5 years in the four study villages is about 465. Malaria transmission is perennial and seasonal in the district and peaks during the rainy season (from May to October). The entomological inoculation rate (EIR) was estimated at 200 infected/bites/person/year in the study area (Nebie *et al.*

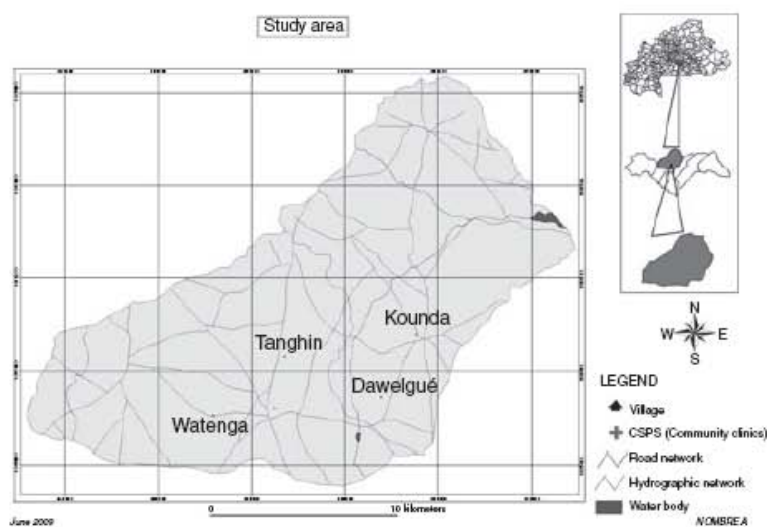


Figure 1 Map of the study area indicating the four study villages.

I. Soulama *et al.* Seasonal variation EBA-175 allelic forms in Burkina Faso

2008). In 2007, the incidence of clinical malaria cases in children less than 5 years old living in Saponé Health District was estimated at 0.7 episode/child-year at risk (Sirima BS and others, unpublished data).

Ethical clearance

This study is part of a large epidemiology study whose protocol (DMID protocol 06-0020) was reviewed by the Office of Clinical Research Affairs (OCRA) within the Division of Microbiology and Infectious Disease (DMID at National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) the USA. The Protocol was also approved by the Burkina Faso Health Research Ethics Review Committee. Written informed consent was obtained from the parents or guardians of all the children participating prior to the enrolment.

Sample collection

A finger prick blood sample was collected on filter paper (Whatman No. 2) from 528 and 486 children aged 3–59 months living in the four study villages, during two cross-sectional surveys conducted in February and September 2007, constituting the middle of the low and the peak of malaria high transmission seasons, respectively. Before the genotyping, the blood filter paper samples were stored at room temperature with silica gel desiccant.

For the purpose of this study, 336 and 334 samples were randomized in low and high transmission season respectively, for DNA extraction and *eba-175* genotyping. The samples were selectively randomized from each transmission season and each village to fulfil the statistical minimum size of 182 PCR positives samples required for each season for the data analysis. Thick and thin blood smears were also prepared for microscopic diagnosis and parasite count.

Asexual *Plasmodium falciparum* parasites density

Thick and thin blood smears were stained with Giemsa. The number of asexual *P. falciparum* parasites was estimated against 200 leucocytes and parasite density was calculated assuming a mean of 8000 leucocytes per μl . A sample was declared negative after examining 200 thick film fields without observing any asexual parasites.

Parasite DNA extraction and genotyping

The DNA was extracted using Qiagen commercial kits (QIAamp DNA blood Mini kit[®]) and conserved at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until amplification was performed. *eba-175* genotyping

was performed as described elsewhere by a nested polymerase chain reaction (PCR) (Toure *et al.* 2001). Primers sequences for the first (nested) amplification were: *eba1* 5'-CAAGAAGCAGTTCCTGAGGAA-3' (forward) and *eba2* 5'-TCTCAACATTCATATTAACAATTC-3' (reverse). For the second (nested) amplification the following primers were used: *eba3* 5'-GAG-GAAAACACTGAAATAGCACAC-3' (forward) and *eba4* 5'-CAATTCCTCC-AGACTGTTGAACAT-3' (reverse).

The first and second amplification were performed under the following conditions: 2 μl of DNA template for the first and 1 μl PCR-product for the second reaction; 1 μM of each Primer, 1 U Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich CHEME GMBH), 2 μl of $10\times$ PCR-Buffer (Sigma-Aldrich CHEME GMBH) as supplied by the manufacturer and 200 μM dNTP (SIGMA-Aldrich CHEME GMBH) were used for the both reaction for a 20 μl final volume. The amplification reaction was performed on a PTC 100[™] Thermocycler (MJ Research, Inc.) using the following reaction conditions: 29 cycles (first reaction) and 24 cycles (second reaction) of denaturation at $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min, annealing at $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 min and extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min followed by a final extension period of 3 min at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The second amplification products were separated on 1.5% ethidium bromide stained agarose gel and were visualized on UV-transillumination.

Quality control and data interpretation

Plasmodium falciparum CAMP (MRA-149) and FCR3 (MRA-102) lines were provided by MR4, ATCC[®] Manassas Virginia and were used as positives controls during the amplification reactions. To confirm the results, 20% of the sample extracts were re-amplified using the nested primers (*eba3* and *eba4*) only, following whole genome amplification (Qiagen).

The CAMP allele was identified as a single fragment of ~ 714 bp in length while the FCR3 allele was a single fragment of ~ 795 bp relative to CAMP and FCR3 controls. Mixed infections were defined as the simultaneous presence of the F and C fragment in the same sample (Figure 2).

Statistical analysis

Allelic population data were analysed using Epi Info v6.04a (<http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/EI6dnjp.htm>) and Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Due to the presence of mixed infections in the population (approximately 1/3 of all the infections), some samples displayed more than one *eba-175* allele, while the rest showed a

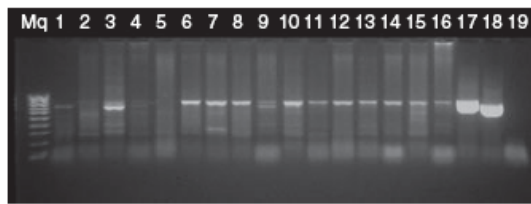
I. Soulama *et al.* Seasonal variation EBA-175 allelic forms in Burkina Faso

Figure 2 Nested polymerase chain reaction of *eba-175* products. Lane Mq: DNA 100 bp ladder; Lanes 1, 6–8, 11–16: FCR-3 genotypes; Lanes 3, 4, 9: Mixed infections (FCR-3 plus CAMP genotypes); Lane 17: FCR-3 positive control; Lane 18: CAMP positive control; Lane 19: Nested PCR negative controls.

single allele (Figure 2). Comparisons were made using the Chi squared or Fisher's exact test, and the Student's *t*-test and ANOVA for normally distributed continuous data.

To analyse whether allele frequencies varied across the two transmission seasons regardless of geographical location (village), data were pooled from the four villages and allele frequencies compared between the high and low transmission seasons.

Secondly, to investigate whether geographical location (i.e. village) or transmission season within a particular village explained a significant proportion of the variation in the data, the data were organized into eight populations and four groups. Each group represents one village while each population represents a further subdivision of the data into high and low transmission season samples, such that each group contains two populations. For this purpose, the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was used implemented in Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.* 1992, 2005). *V_a* estimates the amount of variation in the data explained by transmission season, *V_b* estimates the amount of variation due to different transmission season within individual villages, and finally *V_c* calculate the amount of variation found within each village/transmission season combination in the study population. 10 000 permutations were run for the AMOVA analysis and populations were considered to be significantly differentiated at $P < 0.05$ (Excoffier *et al.* 2005).

To explore genetic differentiation based on genetic distance method between the four study villages, population pairwise F_{ST} values (computed genetic distance, ranges 0–1) were assessed and the results interpreted according to guidelines suggested by Sewall Wright (Hartl & Clark 1989). Briefly: 'The range of F_{ST} values 0–0.05 may be considered as indication little genetic differentiation; the range of 0.05–0.15 indicates moderate genetic differentiation; The range of 0.15–0.25 indicates great genetic

differentiation; Values of F_{ST} above 0.25 indicate very great genetic differentiation'.

Standard diversity indices (gene diversity) were also assessed to estimate genetic diversity, the probability that two randomly chosen haplotypes are different in each population (Nei 1987).

Results

Seventy-one of 336 samples (21.1%) in low and 105 of 334 samples (31.4%) in high transmission season analysed in this study were negative slides. With the PCR reactions 45 of 336 samples (13.4%) and 95 of 334 samples (28.4%) were negatives in low and high transmission season respectively.

Finally, the *eba-175* genotypes were obtained for malaria parasites from a total of 530 samples from four villages, 291 and 239 during low and high transmission respectively that were used for the subsequent analysis. The proportion of male and female participants in total population was 1.2:1 (male/female). The mean participant age was 3.1 years [95% confidence interval (CI), 3.1–3.3]. The geometric mean of parasite density, although slightly higher in CAMP infections, was not statistically different between CAMP, FCR3 and mixed infections (P -value = 0.69) (Table 1). Genetic diversity was moderately high for all four villages (Table 2). Unsurprisingly, the two villages with the largest sample sizes, Kounda and Tanghin, showed the greatest diversity, though diversity did not differ significantly among villages.

eba-175 allele's distribution in four study villages across two transmission seasons

In the entire study population, F and C alleles were present as single genotype infections in 56.6% (300/530) and 14.2% (75/530) of the participants, respectively. The remaining enrolled children, 29.2% (155/530), showed mixed infections (F+C alleles) (Table 1). Moreover, the proportion of samples carrying mixed infections showed a statistically significance decrease ($P = 0.01$, χ^2 test) between the low transmission season [33.7% (98/291)] and the high transmission season [23.8% (57/239); Table 1].

Comparison of allele frequency between high and low transmission seasons

For this analysis data were pooled from the four villages in order to compare allele frequencies from the high and low transmission seasons. The pairwise population F_{ST} indicated no statistical differences in allele frequencies

I. Soulama *et al.* Seasonal variation EBA-175 allelic forms in Burkina Faso**Table 1** Proportion of *eba*-175 genotypes and Geometric Means of parasites densities (*P. falciparum* trophozoites/ μ l)

Types of infections	Low transmission season ($n = 291$) n (%)	High transmission season ($n = 239$) n (%)	Total population $n = 530$ n (%)	Geometric mean of parasite density/ confidence intervals
CAMP infections	35 (12)	40 (16.7)	75 (14.2)	2404 (1480–4024)
FCR3 infections	158 (54.3)	142 (59.4)	300 (56.6)	2346 (1808–2921)
Mixed infections	98 (33.7)*	57 (23.8)*	155 (29.2)	2043 (1480–2697)
All infection	291 (100)	239 (100)	530 (100)	2257 (1998–2697)
<i>P</i> -values	< 0.0001†	< 0.0001‡	< 0.0001§	0.69¶

*The prevalence of the mixed infections (FCR3 plus CAMP) cases decrease significantly ($P = 0.01$) from the low season to the high season.

†*P*-value [comparison of the proportion of FCR3, CAMP and Mixed (FCR3 + CAMP) infections during the low transmission season].

‡*P*-value [comparison of the proportion of FCR3, CAMP and Mixed (FCR3 + CAMP) infections during the high transmission season].

§*P*-value [comparison of the proportion of FCR3, CAMP and Mixed (FCR3 + CAMP) infections in the total (low and high season) population].

¶*P*-value [comparison of the Geometric Mean of Parasite Density between FCR3, CAMP and mixed (FCR3 + CAMP) infections in the total population].

between the two seasons ($F_{ST} = 0.00277$; P -value = 0.12, Figure 3).

Village-seasonal distribution and genetic differentiation in the *eba*-175 alleles

Significant differences were observed in allele frequencies, with the F-allele being twice as common as the C-allele within each study village and across seasons (Table 2). No difference in F- and C- allele distribution was observed between villages or transmission seasons.

Analysis of the pairwise F_{ST} s between the eight populations according to Stewall guidelines showed little genetic differentiation (F_{ST} values between 0 and 0.05) between all study villages except between Dawelgué in high season and in Tanghin low season (F_{ST} -value = 0.10415); Dawelgué and Tanghin in high season (F_{ST} -value = 0.08244), and Tanghin and Watenga in low season (F_{ST} -value = 0.07414) where the genetic differentiation was moderate. There is no major genetic differentiation between study villages with a $F_{ST} > 0.15$ (Table 3).

Table 2 Allele frequencies and molecular diversity indexes in the four study villages during the high and low transmission seasons

Population allele frequencies						χ^2
Low season	Alleles	Dawelgué ($n = 61$)	Kounda ($n = 130$)	Tanghin ($n = 166$)	Watenga ($n = 32$)	<i>P</i> -value
	FCR3	0.70	0.66	0.62	0.75	0.42*
	CAMP	0.30	0.34	0.38	0.25	0.42†
<i>P</i>		<< 0.0001	<< 0.0001	0.00001	<< 0.0001	
High season	Alleles	Dawelgué ($n = 68$)	Kounda ($n = 112$)	Tanghin ($n = 98$)	Watenga ($n = 18$)	
	FCR3	0.78	0.65	0.61	0.62	0.13‡
	CAMP	0.22	0.35	0.39	0.38	0.13§
<i>P</i>		<< 0.0001	0.0002	0.002	0.008	
Molecular diversity Indexes						
	Number of gene copies	103	192	193	42	
	Gene diversity	0.4744	0.5834	0.6165	0.4843	0.07¶
	Standard Deviation of Gene diversity	0.0440	0.0250	0.0163	0.0765	

n represents the total number of alleles in each village.

**P*-value comparing the frequency of F alleles between the four study villages during the low transmission season.

†*P*-value comparing the frequency of C alleles between the four study villages during the low transmission season.

‡*P*-value compare the frequency of F alleles between the four study villages during the high transmission season.

§*P*-value compare the frequency of C alleles between the four study villages during the high transmission season.

¶*P*-value comparing the genetic diversity between study villages.

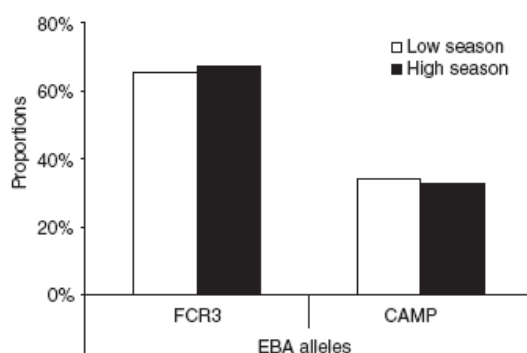


Figure 3 Temporal distribution of *eba-175* alleles. $F_{ST} = 0.00277$; $P = 0.12$.

Analysis of molecular variance (AMOVA) within populations and transmission seasons

The variance analysis indicated that the vast majority of the variance (98.2%) in the data is contained within individual populations, or village/season combinations (Table 4). In addition, when looking within transmission seasons, villages account for a small but significant proportion of the variance (2.22%; P -value = 0.04). In contrast, transmission season did not appear to contribute to the variance (Table 4).

Discussion

The Erythrocyte Binding Antigen 175, one of the promising candidates in the malaria vaccine pipeline, has been studied in different malaria endemic areas (Cramer *et al.* 2004; Toure *et al.* 2001, 2006). The central role of this antigen in

erythrocyte invasion warrants a clearer understanding of genetic polymorphism in this gene (Camus & Hadley 1985; Klotz *et al.* 1992; Orlandi *et al.* 1992; Sim *et al.* 1994). The present study was designed to evaluate the seasonal variation of the frequencies of *P. falciparum* erythrocyte binding antigen-175 alleles in malaria positives children under age five, living in four endemic villages located in southwestern Burkina Faso.

The higher frequency of the F- compared with the C- allele that we observed in this study is consistent with findings from Ghana, (Cramer *et al.* 2004) and Gabon (Toure *et al.* 2006), suggesting that the F-allele may predominate throughout West and Central Africa, and that the distribution of alleles is relatively stable over 8 months, including a low and high transmission season. In contrast, in East Africa, where malaria endemicity is low, the C- allele has been shown to be the most common (Binks *et al.* 2001). By way of comparison, a study in Laos People's Democratic Republic reported significant difference in the distribution of *eba-175* alleles when the northern and the southern provinces were compared. There are several explanations as to why F- and C- allele frequencies differ among geographical regions. One explanation is random shifts in parasite allele frequencies due to genetic drift in genetically isolated populations (Cramer *et al.* 2004). In this case allele frequencies might be predicted to change over time. Another possibility is that differences in the host genetic background among study population may select for different *eba-175* alleles in which case stable allele frequencies would be predicted (Dittrich *et al.* 2003).

To our knowledge, this study is one of the first to analyse seasonal variation of the *eba-175* allelic dimorphism between low and high malaria transmission seasons in an endemic area. We found that fluctuations in transmission

Table 3 Population pairwise F_{ST} Distance method: Pairwise difference

	1(D_L)	2(D_H)	3(K_L)	4(K_H)	5(T_L)	6(T_H)	7(W_L)	8(W_H)
1(D_L)	0.00000							
2(D_H)	0.00938	0.00000						
3(K_L)	0.00180	0.03762	0.00000					
4(K_H)	0.00655	0.04515*	-0.00923	0.00000				
5(T_L)	0.02328	0.10415*	0.01314	0.01716	0.00000			
6(T_H)	0.02925	0.08244*	-0.00069	-0.00643	0.01489	0.00000		
7(W_L)	-0.00173	-0.01686	0.00596	0.00733	0.07414*	0.03371	0.00000	
8(W_H)	-0.04672	-0.02920	-0.02406	-0.01657	0.01454	0.00859	-0.03973	0.00000

D_L, Dawelgué Low season; D_H, Dawelgué High season; K_L, Kounda Low season; K_H, Kounda High season; T_L, Tanghin Low season; T_H, Tanghin High season; W_L, Watenga Low season; W_H, Watenga High season. Significance level = 0.0500.

*Significant test $P \leq 0.05$; P (D_H/K_H) = 0.018; P (D_H/T_L) = 0.009; P (D_H/T_H) << 0.00001; P (T_L/W_L) = 0.009.

I. Soulama *et al.* Seasonal variation EBA-175 allelic forms in Burkina Faso**Table 4** Variance in *eba-175* alleles frequencies

Hierarchical level	Variance	% total variation	<i>P</i> -value	ϕ -statistic†
Among transmission season	−0.0015	−0.41	0.601	$\phi_{CT}^{\ddagger} = -0.00408$
Among village/within transmission season	0.00808	2.22	0.042	$\phi_{SC}^{\S} = 0.02211$
Within populations	0.36166	98.18	0.0108	$\phi_{ST}^{\P} = 0.01812$

† ϕ -statistic (average *F*-statistic Indices over loci).

‡ ϕ_{CT} , *F*-statistic indices by permuting populations among transmission seasons.

§ ϕ_{SC} , *F*-statistic indices by permuting haplotypes among villages within transmission seasons.

¶ ϕ_{ST} , *F*-statistic, indices by permuting haplotypes within village within transmission seasons.

level had no effect on the distribution of *eba-175* alleles except the decrease of mixed infection cases from low to high season which could be explained by the cases management facilities with care free on charge set up in the health community clinic during the 1 year passive follow up. Indeed the accessibility improved by the care free on charge increased the attendance rate at the community health clinics and consequently the reduction of the number of malaria episodes by regular and frequent management of cases. The artemisine-based combination therapy used at the community health clinics for uncomplicated malaria case treatments would clean the sensitive genotypes with a possible reduction of the number of mixed infection from children.

The lack of change in allele frequencies across transmission seasons supports the prediction that distribution of the two allelic forms of *eba-175* gene is relatively stable over time. The separated comparison of allele distribution across villages further indicates stability throughout the geographic region sampled, despite moderate genetic differentiation among some villages.

The fact that the study villages were located close to each other (within an 8 km radius) could explain the observed similarity in F- and C-alleles diversity and the absence of restricted gene flow demonstrated by the low or moderate genetic differentiation, such that we are essentially sampling a single panmictic parasite population. But, it is also possible that the genetic background (most of the study population are from the ethnic majority group, Mossi) may contribute to the homogeneity of the *eba-175* alleles distribution, as it has been previously suggested by the findings in Laos People's Democratic Republic study where a significant difference in *eba-175* allele distribution was showed between the North and South province with different ethnic groups (Dittrich *et al.* 2003). The apparent stability of *eba-175* allele frequencies in the four villages in this study suggests that it is a suitable area to test vaccine candidates targeting this antigen.

Broader regional sampling in sub-Saharan sites will address broader boundaries within Africa. A large scale

geographic comparison study that includes different sub-Saharan African countries which takes into consideration both isolation by distance and differences in the genetic background of the host is recommended to further address the factors contributing to the distribution of *eba-175* alleles.

Conclusion

This comparative analysis of the allelic dimorphism of the *eba-175* gene in *P. falciparum* isolates from low and high transmission seasons indicates that the dimorphism was not affected by seasonal fluctuations in transmission intensity. This analysis highlights the importance of assessing the distribution of *eba-175* allelic forms in different sentinel sites within the same country as well as in neighbouring countries. These findings will inform strategies for the development of malaria vaccine trial sites.

Acknowledgements

We express our gratitude to the population of the four villages for their kind cooperation and support of the study, the health staff of Saponé Health District as well as all the investigation staff of CNRFP. We also thank MR4 (ATCC[®], Manassas, VA, USA) for providing us with malaria parasites and Timothy Stedman and Linda Amoah for providing training under the MR4 Workshop 'Assessing the diversity of vaccine antigen and drug resistance markers in field isolates', Ouagadougou Burkina Faso 2008; Dr Deirdre A. Joy, Program Officer, Parasite Genomics (Parasitology and International Programs Branch, Division of Microbiology and Infectious Diseases, NIAID/NIH/DHHS) for her assistance with the statistical analyses and critically reading the manuscript.

This study was supported by the regular budget of National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Department of Infectious Disease, MD (NIH/NIAID/DMID (DMID Protocol N°06-20, Contract HHSN266200400016C).

References

- Adams JH, Blair PL, Kaneko O & Peterson DS (2001) An expanding ebl family of *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitology* 17, 297–299.
- Adams JH, Sim BK, Dolan SA, Fang X, Kaslow DC & Miller LH (1992) A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89, 7085–7089.
- Binks RH, Baum J, Oduola AM, *et al.* (2001) Population genetic analysis of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 114, 63–70.
- Camus D & Hadley TJ (1985) A *Plasmodium falciparum* antigen that binds to host erythrocytes and merozoites. *Science* 230, 553–556.
- Cramer JP, Mockenhaupt FP, Mohl I, *et al.* (2004) Allelic dimorphism of the erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene of *Plasmodium falciparum* and severe malaria: significant association of the C-segment with fatal outcome in Ghanaian children. *Malaria Journal* 3, 11.
- Dittrich S, Schwobel B, Jordan S, *et al.* (2003) Distribution of the two forms of *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen-175 (eba-175) gene in Lao PDR. *Malaria Journal* 2, 23.
- Duraisingh MT, Maier AG, Triglia T & Cowman AF (2003) Erythrocyte-binding antigen 175 mediates invasion in *Plasmodium falciparum* utilizing sialic acid-dependent and -independent pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100, 4796–4801.
- Excoffier L, Estoup A & Cornuet JM (2005) Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers. *Genetics* 169, 1727–1738.
- Excoffier L, Smouse P & Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T, Good RT, Duraisingh MT & Cowman AF (2003) A novel erythrocyte binding antigen-175 paralogue from *Plasmodium falciparum* defines a new trypsin-resistant receptor on human erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 14480–14486.
- Hadley TJ, Klotz FW, Pasvol G, *et al.* (1987) *Falciparum* malaria parasites invade erythrocytes that lack glycophorin A and B (MkMk). Strain differences indicate receptor heterogeneity and two pathways for invasion. *The Journal of Clinical Investigation* 80, 1190–1193.
- Hartl DL & Clark AG (1989) *Principles of Population Genetics*, 2nd edn Sinauer Associates, Massachusetts.
- Kain KC, Orlandi PA, Haynes JD, Sim KL & Lanar DE (1993) Evidence for two-stage binding by the 175-kD erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Experimental Medicine* 178, 1497–1505.
- Klotz FW, Orlandi PA, Reuter G, *et al.* (1992) Binding of *Plasmodium falciparum* 175-kilodalton erythrocyte binding antigen and invasion of murine erythrocytes requires N-acetylneuraminic acid but not its O-acetylated form. *Molecular and Biochemical Parasitology* 51, 49–54.
- Kobbe R, Neuhoff R, Marks F, *et al.* (2006) Seasonal variation and high multiplicity of first *Plasmodium falciparum* infections in children from a holoendemic area in Ghana, West Africa. *Tropical Medicine & International Health* 11, 613–619.
- Lobo CA, Rodriguez M, Reid M & Lustigman S (2003) Glycophorin C is the receptor for the *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding ligand PFEbP-2 (baeb). *Blood* 101, 4628–4631.
- Luxemburger C, White NJ, Webster HK, *et al.* (1996) The epidemiology of malaria in a Karen population on the western border of Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90, 105–111.
- Maier AG, Duraisingh MT, Reeder JC, *et al.* (2003) *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nature Medicine* 9, 87–92.
- Miller LH & Greenwood B (2002) Malaria—a shadow over Africa. *Science* 298, 121–122.
- Molineaux L & Gramiccia G (1980) *The Garki Project, Research on the Epidemiology and Control of Malaria in the Sudan Savanna of West Africa*. WHO, Geneva.
- Nebie I, Diarra A, Ouedraogo A, *et al.* (2008) Humoral responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens and association with incidence of clinical malaria in children living in an area of seasonal malaria transmission in Burkina Faso, West Africa. *Infection and Immunity* 76, 759–766.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Okoyeh JN, Pillai CR & Chitnis CE (1999) *Plasmodium falciparum* field isolates commonly use erythrocyte invasion pathways that are independent of sialic acid residues of glycophorin A. *Infection and Immunity* 67, 5784–5791.
- Orlandi PA, Klotz FW & Haynes JD (1992) A malaria invasion receptor, the 175-kilodalton erythrocyte binding antigen of *Plasmodium falciparum* recognizes the terminal Neu5Ac (alpha 2-3) Gal- sequences of glycophorin A. *The Journal of Cell Biology* 116, 901–909.
- Rogier C, Orlandi-Pradines E, Fusai T, Pradines B, Briolant S & Almeras L (2006) Malaria vaccines: prospects and reality. *Medicine for Malaria Infection* 36, 414–422.
- Roper C, Elhassan IM, Giha H, *et al.* (1998) Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village. *Parasitology* 116, 501–510.
- Sim BK, Chitnis CE, Wasniowska K, Hadley TJ & Miller LH (1994) Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Science* 264, 1941–1944.
- Sim BK, Orlandi PA, Haynes JD, *et al.* (1990) Primary structure of the 175K *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen and identification of a peptide which elicits antibodies that inhibit malaria merozoite invasion. *The Journal of Cell Biology* 111, 1877–1884.

I. Soulama *et al.* Seasonal variation EBA-175 allelic forms in Burkina Faso

- Theander T (1998) Unstable malaria in Sudan. The influence of the dry season. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92, 589–592.
- Toure FS, Bisseye C & Mavoungou E (2006) Imbalanced distribution of *Plasmodium falciparum* EBA-175 genotypes related to clinical status in children from Bakoumba, Gabon. *Clinical Medical Research* 4, 7–11.
- Toure FS, Mavoungou E, Ndong JM, Tshipamba P & Deloron P (2001) Erythrocyte binding antigen (EBA-175) of *Plasmodium falciparum*: improved genotype determination by nested polymerase chain reaction. *Tropical Medicine & International Health* 6, 767–769.
- Ware LA, Kain KC, Lee Sim BK, Haynes JD, Baird JK & Lanar DE (1993) Two alleles of the 175-kilodalton *Plasmodium falciparum* erythrocyte binding antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology* 60, 105–109.
- World Health Organization (2006) *WHO Guideline for the Treatment of Malaria*. (WHO/HTM/MAL/2006) WHO, Geneva.
- World Health Organization (2008) *World Malaria Report 2008*. (WHO/HTM/GMP/2008.1) WHO, Geneva.

Corresponding Author Sodiomon B. Sirima, Centre National de Recherche et de Formation sur le Paludisme (CNRFP), Ouagadougou, 01 BP 2208 Ouagadougou 01, Burkina Faso. Tel.: +226 50 32 46 95/6; Fax: +226 50 30 52 20; E-mail: s.sirima.cnlp@fasonet.bf, gras@fasonet.bf