

UNIVERSITÉ PARIS VI – PIERRE ET MARIE CURIE

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

Spécialité

Physiopathologie cellulaire et moléculaire

Présentée par

M. Landry-Erik MOMBO

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 6

**Polymorphisme génétique humain (loci G6PD, TNF- α , CD1, MBL
et CCR5) en relation avec la susceptibilité/résistance au paludisme
à *Plasmodium falciparum* et à l'infection à HIV-1 en Afrique
Centrale (Gabon)**

Soutenue le 05 septembre 2003

Devant le jury composé de :

Pr Laurent BELEC,	Président
Dr Christian ROUSSILHON,	Rapporteur
Dr Gérard C. PAUL,	Rapporteur
Dr Adrian LUTY,	Examineur
Pr Philippe BLOT,	Examineur
Dr Rajagopal KRISHNAMOORTHY,	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

- *Aux membres du jury :*

- *Au Professeur Laurent BELEC, je vous exprime ma gratitude pour avoir bien voulu présider ce jury de thèse, malgré les nombreuses charges qui sont les vôtres.*
- *Au Docteur Christian ROUSSILHON, je ne vous remercierai jamais assez d'avoir accepté d'être Rapporteur de cette thèse. Votre généreuse implication, vos judicieuses suggestions et nos passionnantes discussions resteront gravées dans ma mémoire.*
- *Au Docteur Gérard C. PAUL, je vous exprime mes vifs remerciements pour avoir, avec spontanéité, accepté d'être Rapporteur de cette thèse.*
- *Au Professeur Philippe BLOT, Mille mercis pour votre participation à ce jury de thèse en qualité d'Examineur. Votre appui et vos encouragements ont été d'une importance capitale.*
- *Au Docteur Adrian J.F. LUTY, je vous remercie d'avoir accepté, avec enthousiasme, d'être Examineur de cette thèse.*
- *Au Docteur Rajagopal KRISHNAMOORTHY, mon Directeur de thèse, je vous exprime ma gratitude pour avoir bien voulu diriger cette thèse. Votre vif esprit scientifique est un modèle et nos discussions, certes quelquefois difficiles, ont toujours été riches d'enseignements.*

- *Au Centre International de Recherches Médicales de Franceville :*

- *Aux Dirigeants de cette Institution de Recherches qui a été la "pierre angulaire" de ce travail. Du Professeur Alain J. GEORGES au Professeur Philippe BLOT, vous avez cru en mes possibilités en me confiant ce travail, je vous exprime ma gratitude à travers les publications afférentes. J'exprime également ma gratitude au Docteur Joseph LANSOUD-SOUKATE et au Directeur des Ressources Humaines M. Norbert MOUYABI.*
- *Aux Chercheurs avec lesquels j'ai eu à travailler au CIRMF, j'exprime mes remerciements. En particulier, le Docteur Chang Yong LU qui m'a initié à la biologie moléculaire, et les autres membres de l'UGENPG, le Docteur Lucas SICA et MM. Simon OSSARI, S. MURALITHARAN, Cyrille BISSEYE et Raphaël MOUKAGNI. Je remercie également les Docteurs Elie MAVOUNGOU, Guy DUBREUIL, Marie-Thérèse EKALA, Maria MAKUWA, Denise-Patricia MAWILI-MBOUMBA, Benjamin OLLOMO, Richard ONANGA, Francine NTOUMI et Jeanne MOMBA-SICA.*

- *Au personnel du CIRMF, merci pour votre confiance et votre bonne humeur, notamment Viviane NGONDI-BAYINDA, Jean Noël EYA, Léonard NGUIANDOUGOU, Georges ETOCKO, Faustin LEKOULOU, Justice MAYOMBO, Issa BEDJABAGA et André MOUSSAVOU.*
- *Un remerciement particulier à Albertine, Maman Simone, Céline, ma "fille" Yvette MANDEME et ma "sœur" Régina MOUSSAVOU-OLLOMO.*
- *Merci pour les ambiances de l'équipe "droit au but", Benjamin, Touré, Eric, Sylvain, Adjo, André, Maguy, Innocent, Brice et Patrick.*

• *A l'INSERM U458 de l'Hôpital Robert Debré :*

- *Au Professeur Jacques ELION, Directeur de cette Unité, dont la simplicité est appréciable et qui m'a ouvert les portes de son Unité, je dis merci.*
- *Au Docteur Claudine LAPOUMEROULIE, dont la sympathie n'a d'égale que l'ardeur au travail. Je te remercie pour ton aide précieuse au Laboratoire et en dehors.*
- *A Nathalie GERARD, toujours disponible, je te remercie beaucoup.*
- *Aux autres membres de l'Unité, je vous remercie pour votre sympathie, notamment Pierre LEHN, Michelle HAUCHECORNE, Noufissa OUDHRIRI, Abder AISSAOUI, Thérèse MARIANNE-PEPIN et Marc ROMANA. Special thanks to Manuel BRUN (courage pour la thèse), Patricia ESCOBAR-PARAMO (la colombe), Samia ZERTAL, Tony LEGALL, Olivier PRADILLON, Florence HOMMAIS, Irénée KUEVIKUE et Célestin TOSSOU (étage -4).*
- *Enfin merci pour le service trois-pièces impeccable: Claudine BRUNNER (la CB, elle est en OR, et je n'oublie pas son équipe du +3/+1/0), Pascal LACOURTE (simplicité et efficacité) et Anne HACHET.*

• *A mes collaborateurs de l'Hôpital St-Louis: Dr Ryad TAMOUZA, Dr Rajen RAMASAWMY, Jean Claude Poirier, Véronique SCHAEFFER, Catherine FORTIER et Pr Dominique CHARRON.*

• *A mes Maîtres, de l'Ecole publique d'Akébé II de Libreville à l'Université Pierre et Marie Curie de Paris VI, en passant par le Lycée National Léon Mba, l'Université Claude Bernard de Lyon I, l'Université des Sciences et Techniques de Masuku (Gabon) et l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal).*

DÉDICACES

Je dédie ce travail à toutes les filles et à tous les fils d'Afrique décédés du paludisme et du SIDA, notamment à ma sœur Françoise KOUMBA-MAPANGO.

Cette thèse est également dédiée:

- *A la mémoire des membres de ma famille qui nous ont quitté durant le temps de celle-ci, Alphonsine MANFOUMBI-BOUASSA, Roboul BOUROBOU-GANDZA et Louis GANDZA-MOMBO du côté maternel, Alice IMANTSA-KOMBILA (ma muse), Stanislas MAPANGO-KOMBILA, Commandant Mathias BOUSSOUGOU-MAPANGO, Rosine NDOMBI-MBINA, Bignet BIGNOUMBA-KOMBILA, Alain KOUMBA-DIRAMBA et Jean Paul DIRAMBA-DIRAMBA du côté paternel.*
- *A mon père Marc R. MOMBO-KOMBILA et à Pa'Sosthène MOUFTAOU.*
- *A mes mamans Henriette ISSANGA-MOUNDJEGOU et Célestine MOMBO née MOUSSAVOU.*
- *A ma famille maternelle par les personnes de Paul MOUSSAVOU-MOUNDJEGOU et Victorine NZONGA née MANOMBA-BOUASSA.*
- *A ma famille paternelle par les personnes de Pierre MBADINGA-MOUSSAVOU et Jeanne-Amélie MBINA-MANGONDO (Mam'élie).*
- *A tous mes frères et sœurs, notamment Eugénie HELD née IGNANGA-MAPANGO, Yvon AMAMAPESSY-MATOTO et à mes neveux et nièces.*
- *A M. Raymond HELD et à Annick OZENGA et famille.*
- *A Mme Elizabeth Juliette ONANA-ONANA et famille.*
- *A Mme Micheline RICHE et famille.*
- *A tous mes amis du Gabon, du Sénégal, de la France et des Etas-Unis, parmi lesquels Premcoumar SINCAN et Ermine F. IBRAHIM.*
- *A Denise Patricia MAWILI-MBOUMBA, Marie-Thérèse EKALA et Sandra J. YEBGA.*
- *Enfin à mes ancêtres qui veillent sur moi (RANGA et TOUPE) et au Seigneur.*

FINANCEMENT

Le financement de ce travail de thèse (frais de recherches et bourse du doctorant) a été assuré par le Centre International de Recherches Médicales de Franceville, dont les fonds sont constitués par l'Etat gabonais, Elf-Gabon et le Ministère français des affaires étrangères.

L'étude portant sur la relation entre le polymorphisme du gène des co-récepteurs CCR5 et l'infection à HIV-1, a été couverte financièrement dans le cadre du projet ANRS de référence SF/HF/n°601, retenu pour l'appel d'offre 1998 par le Comité Scientifique Sectoriel n°3/4.

Ce travail a fait l'objet de 5 manuscrits dont 4 sont publiés et le dernier est soumis.

En outre, une partie de ce travail a été retenu en terme d'affiche ou de présentation orale lors de 3 conférences internationales:

- The XIth International Conference on AIDS and STDs in Africa (ICASA). Looking into the future: Setting priorities for HIV/AIDS in Africa. September 12-16, 1999. Lusaka, Zambia.
- The third MIM Pan-African Malaria Conference. Global advances in malaria research: Evidence-based decision making for malaria control and policy. November 17-22, 2002. Arusha, Tanzania.
- The 2nd International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment. July 13-16, 2003. Paris, France.

TABLE DES MATIERES

PRÉAMBULE	10
INTRODUCTION	11
A- FACTEURS GÉNÉTIQUES HUMAINS ET INFECTION PALUSTRE	14
1. GÉNÉRALITES	14
1-1. INFECTION PALUSTRE ET PALUDISME	14
1-1-1. Historique et actualités	14
1-1-2. Eléments de biologie	16
1-1-3. Physiopathologie	19
1-1-3-1. Infection plasmodiale ou palustre asymptomatique	20
1-1-3-2. Infection palustre simple ou paludisme simple	22
1-1-3-3. Infection palustre sévère ou paludisme grave	23
1-2. FACTEURS INFLUENÇANT L'INFECTION	
<i>A PLASMODIUM FALCIPARUM</i>	28
1-2-1. Différents types de facteurs	28
1-2-1-1. Facteurs parasitaires	28
1-2-1-2. Facteurs socio-géographiques	29
1-2-1-3. Facteurs de l'hôte	30
1-2-2. Facteurs génétiques	35
1-2-2-1. Drépanocytose ou anémie falciforme	35
1-2-2-2. Ovalocytose (erythrocyte band 3)	36
1-2-2-3. Hémoglobinoses C	37
1-2-2-4. Hémoglobinoses E	38
1-2-2-5. Thalassémies α et β	39
1-2-2-6. Antigènes Duffy	40
1-2-2-7. Antigènes HLA	40
1-2-2-8. Récepteurs endothéliaux ICAM-1 et CD36	41
1-2-3. Antigènes ABO	42
1-2-4. Déficience en glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)	43
1-2-5. Facteur alpha de nécrose des tumeurs (TNF- α)	45
1-2-6. Synthase de l'oxyde nitrique inductible (iNOS ou NOS2)	49
1-2-7. Glycoprotéines membranaires CD1	51

2.	CADRE ET OBJECTIFS	54
2-1.	CADRE DE L'ETUDE	54
2-2.	ETUDES ANTERIEURES	56
2-3.	OBJECTIF GENERAL	57
2-4.	OBJECTIFS SPECIFIQUES	57
3.	MÉTHODOLOGIE	59
3-1.	MATERIEL	59
3-1-1.	Site de Dienga	59
3-1-2.	Sujets	60
3-1-2-1.	Cohorte 1 « Infection palustre simple »	60
3-1-2-2.	Cohorte 2 « Infection palustre asymptomatique »	63
3-2.	METHODES	66
3-2-1.	Extraction d'ADN génomique	66
3-2-2.	Polymorphisme de restriction (RFLP)	67
3-2-3.	Polymorphisme de restriction par mutagenèse dirigée (SDM)	68
3-2-4.	Séquençage	69
3-2-5.	Clonage moléculaire	70
4.	RÉSULTATS	71
4-1.	FACTEURS GÉNÉTIQUES DE L'HÔTE EN RELATION AVEC L'INFECTION PALUSTRE	71
4-1-1.	Facteurs génétiques et infection palustre simple	72
4-1-2.	Facteurs génétiques et infection palustre asymptomatique	80
4-2.	GLYCOPROTEINES CD1 ET INFECTIONS PALUSTRES	86
4-2-1.	Allèles CD1E	86
4-2-2.	Allèles CD1 dans les populations gabonaise et française	91
4-2-3.	Allèles CD1 et infections palustres	92
5.	DISCUSSION	101
5-1.	FACTEURS ERYTHROCYTAIRES	101
5-1-1.	Trait drépanocytaire	101
5-1-2.	Système ABO (groupes sanguins)	102
5-1-3.	Déficiencia en G6PD	103
5-2.	FACTEURS IMMUNITAIRES SOLUBLES	107
5-2-1.	Facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α)	107
5-2-2.	NO Synthase inductible (NOS2)	109

5-3.	MOLECULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES	
	NON PEPTIDIQUES	111
5-3-1.	Polymorphisme du gène CD1E	112
5-3-2.	Allèles CD1A et CD1E	112
5-3-3.	CD1E et l'infection palustre	113
B-	FACTEURS GÉNÉTIQUES HUMAINS ET INFECTION	
	À HIV (VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE)	117
1.	GÉNÉRALITES	117
1-1.	INFECTION A HIV	117
1-1-1.	Historique et actualités	117
1-1-2.	Éléments de biologie	119
1-1-2-1.	Structure du HIV-1	119
1-1-2-2.	Réplication du HIV-1	121
1-1-2-3.	Diversité du HIV-1	124
1-1-3.	Physiopathologie	126
1-1-3-1.	Phase de primo-infection	128
1-1-3-2.	Phase asymptomatique	130
1-1-3-3.	Phase immunodépressive	131
1-2.	FACTEURS GENETIQUES DE L'HOTE	133
1-2-1.	Différents facteurs de l'hôte	134
1-2-2.	Chémokines	136
1-2-3.	Récepteurs à chémokines	140
1-2-3-1.	Récepteurs CXCR4	140
1-2-3-2.	Récepteurs CCR5	141
1-2-3-3.	Région promotrice du gène CCR5	142
1-2-3-4.	Récepteurs accessoires CCR2b et CX3CR1	144
1-2-4.	Protéine liant le mannose MBL	146
1-2-5.	Gènes régulant la fonction immune	149
2.	CADRE ET OBJECTIFS	154
2-1.	CADRE DE L'ETUDE	154
2-2.	ETUDES ANTERIEURES	154
2-3.	OBJECTIF GENERAL	156
2-4.	OBJECTIFS SPECIFIQUES	156

3. MÉTHODOLOGIE	157
3-1. MATERIEL	157
3-1-1. Sites d'étude	157
3-1-2. Sujets	157
3-2. METHODES	158
3-2-1. Polymorphisme de restriction (RFLP)	158
3-2-2. Electrophorèse en gel de gradient dénaturant (DGGE)	160
3-2-2-1. Principe	160
3-2-2-2. Applications (CCR5, CCR5 promoteur et MBL)	161
4. RÉSULTATS	166
4-1. VARIANTS GENETIQUES DES CO-RECEPTEURS EN RELATION AVEC L'INFECTION A HIV-1	166
4-1-1. Mutations dans la région codante du gène CCR5	166
4-1-2. Allèles de SDF-1, CCR2b et de la région promotrice de CCR5	167
4-1-3. Liaisons entre les allèles CCR2b-V64I et CCR5-promoteur	173
4-2. VARIANTS GENETIQUES DE MBL EN RELATION AVEC L'INFECTION A HIV-1	176
5. DISCUSSION	183
5-1. VARIANTS DE RECEPTEURS A CHEMOKINES ET INFECTION A HIV-1	183
5-1-1. Méthode d'analyses par DGGE	183
5-1-2. Etude d'association des polymorphismes du promoteur	184
5-2. VARIANTS DE LA PROTEINE MBL ET INFECTION A HIV-1	187
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	 188
 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 192
 ANNEXES	 215

PRÉAMBULE

Nous voudrions par ce préambule, situer le contexte particulier qui a conduit à la réalisation de ce travail de thèse.

Ce travail est le fruit d'une collaboration Nord-Sud entre l'INSERM U458 de l'Hôpital Robert Debré à Paris et le Centre International de Recherches Médicales de Franceville au Gabon. Nous avons le souci d'effectuer un travail sur le terrain (au Gabon) permettant un échange fructueux entre les deux parties.

D'un coté, nous avons effectué un transfert de technologie en tenant compte des réalités africaines parfois difficiles mais souvent passionnantes. De l'autre, nous avons été édifiés au contact des populations locales notamment lors de la réalisation de cohortes d'études. Nous avons appréhendé l'approche sociale et la gestion humaine de ce métier, souvent peu mis en exergue.

Nous avons aussi, au cours de ces années de thèse, "fait nos armes" dans l'enseignement et réalisé un travail de vulgarisation :

- au Gabon, par l'intervention dans les lycées et collèges mais également dans les universités (Université de Sciences et Techniques de Masuku à Franceville)
- en France, l'encadrement d'étudiant en maîtrise de biologie (Université Paris XIII).

Ce travail a été, pour nous, un investissement et un engagement total à la hauteur des difficultés rencontrées. L'ampleur des sujets abordés, indique notre désir d'apporter une contribution transversale en vue d'investir des points manquants en terme de génétique de l'hôte humain en Afrique centrale (région peu étudiée bien que foyer potentiel de pandémies dévastatrices).

Nous avons donc voulu par cette note préliminaire, retenir votre attention sur l'expérience ardue mais combien enrichissante qu'a constitué ce travail et qui serait peu visible à travers ce mémoire.

INTRODUCTION

Un continent. L'Afrique, le continent le plus appauvri du globe, détient tristement et largement le taux de mortalité le plus élevé de la planète. Trois maladies infectieuses y contribuent majoritairement, ce sont la tuberculose, le paludisme et le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise).

Des ravages humains. Les statistiques mondiales de ces 3 maladies (En 2002, SIDA: 3,1 millions de morts, tuberculose: 2 millions de décès, paludisme: plus d'un million de morts) ont d'ailleurs incité à la création du Fond Mondial de Lutte contre le SIDA, la Tuberculose et le Paludisme [Site web globalfundatm.org].

Une parasitose omniprésente. Le paludisme, maladie parasitaire la plus importante, pose aujourd'hui un problème de santé publique dans plus de 90 pays représentant au total quelque 2,4 milliards de personnes, soit 40% de la population mondiale. L'incidence du paludisme est estimée à 300-500 millions de cas cliniques par an, dont plus de 90% surviennent en Afrique subsaharienne. La mortalité due au paludisme est évaluée à plus d'un million de morts par an (ou une personne toutes les 30 secondes) dont une grande majorité survenant chez les jeunes enfants en Afrique subsaharienne, notamment dans les régions reculées. Le paludisme tue journallement 3000 enfants de moins de 5 ans, soit une mortalité infantile largement supérieure à celle résultant du SIDA [Site web who.int].

Une virose meurtrière. Dans la population générale, les chiffres concernant l'infection à virus de l'immunodéficience humaine (HIV) ont pris une allure exponentielle ces dernières années sur le continent africain. En effet, sur 42 millions de personnes infectées par le HIV en fin 2002 dans le monde, 29,4 millions vivent en Afrique subsaharienne. On y compte aussi 3,5 millions de nouveaux cas d'infection à HIV (soit 70% du taux mondial) et 2,4 millions d'Africains décédés du SIDA en 2002 [Site web unaids.org].

Quant à la tuberculose, ses épidémies sont à nouveau fréquentes principalement en Afrique sub-saharienne compte tenu de l'association avec les infections à HIV.

Des déterminants. Trois types de facteurs sont déterminants pour le développement de ces pandémies:

- les facteurs liés à l'agent causal de la maladie c'est-à-dire le parasite pour le paludisme et le virus pour l'infection à HIV
- les facteurs liés à l'hôte
- mais aussi les facteurs sociaux et géographiques tels que l'accès au traitement.

En Afrique subsaharienne, peu d'études ont été réalisées sur les déterminants de ces pandémies. En Afrique centrale en particulier, les travaux de recherches sont plus encore en nombre limité. Alors que cette partie de l'Afrique occupe une place "pivot" en ce qui concerne le paludisme et l'infection à HIV.

Dans ce travail de thèse, nous avons apporté notre contribution en nous intéressant aux facteurs liés à l'hôte humain. Nous avons travaillé précisément sur les facteurs génétiques de l'hôte africain sub-saharien en relation premièrement avec l'infection palustre et secondairement avec l'infection à HIV.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié l'association entre les facteurs génétiques de l'hôte humain et la susceptibilité/résistance aux différentes formes non graves de l'infection palustre. Les facteurs génétiques évoqués, incluent ceux impliqués dans les formes sévères de l'infection palustre (trait drépanocytaire, déficience en glucose-6-phosphate dehydrogenase, facteur α de nécrose des tumeurs, synthase de l'oxyde nitrique inductible et système sanguin ABO) mais aussi d'autres potentiellement présents dans les mécanismes d'immunité anti-palustre (molécules présentatrices d'antigènes glycolipidiques). Les résultats obtenus nous ont permis d'apporter un éclairage nouveau concernant particulièrement un des allèles du facteur α de nécrose des tumeurs et un des variants génétiques de la déficience en

glucose-6-phosphate dehydrogenase. Nous avons en outre montré pour la première fois une association entre un nouveau facteur génétique (variant génétique de molécules présentatrices d'antigènes) et l'infection palustre.

Dans la seconde partie, nous avons analysé dans la population africaine subsaharienne, les associations entre les facteurs génétiques et la susceptibilité/résistance à l'infection à HIV-1. Les facteurs génétiques étudiés sont ceux impliqués dans les premières étapes de l'infection à HIV-1, précisément en ce qui concerne l'entrée du virus (variants génétiques des récepteurs à chémokines) et la réponse immunitaire non spécifique (variants génétiques de la protéine liant le mannose). Nos données ont permis de confirmer pour la première fois dans une population d'Afrique centrale, les différentes associations avec l'infection à HIV-1. Nous avons parallèlement réaffirmé dans la population africaine subsaharienne, l'implication de variants génétiques différents de ceux présents chez les Caucasiens.

A- FACTEURS GÉNÉTIQUES HUMAINS ET INFECTION PALUSTRE

Avant d'aborder les objectifs de cette première partie de notre travail ancrée sur l'infection palustre, nous évoquerons les caractéristiques générales de cette infection et les différents facteurs génétiques de l'hôte connus comme impliqués dans cette pathologie.

1. GÉNÉRALITÉS

Pour situer notre travail, nous présenterons l'infection palustre et la maladie qui en résulte, le paludisme, avant d'insister sur les différents facteurs génétiques influençant cette infection.

1-1. INFECTION PALUSTRE ET PALUDISME

Après un bref aperçu historique et quelques actualités, nous nous intéresserons à la biologie du parasite de cette infection et à la physiopathologie qui distingue plusieurs formes d'infections palustres.

1-1-1. Historique et actualités

Le paludisme (palus = marais) ou malaria (= mauvais air) tient son origine étymologique de ces zones marécageuses où il sévissait particulièrement sous le nom de "fièvre des marécages". L'agent responsable du paludisme est découvert en novembre 1880 par Charles Alphonse Louis Laveran à Constantine (Algérie). Ensuite, Camillo Golgi montre que les fièvres dues à la malaria, sont causées par deux espèces de parasites, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium vivax*. Deux autres italiens, Marchifava et Bignami, identifient une troisième espèce parasitaire, *Plasmodium falciparum*, associée à une forme dangereuse de la malaria, avant qu'en 1922, Stephens isole une 4^{ème} espèce, *Plasmodium ovale* [Stephens JWW

et al., 1922]. Ronald Ross en 1897, puis Battista Grassi en 1898 confirment la transmission de cette affection par un moustique du genre *Anopheles* en identifiant les formes infectantes du genre *Plasmodium* chez l'anophèle [Gentilini M *et al.*, 1993; Persidis A *et al.*, 2000].

Les vertus de l'écorce de quinquina connues des Indiens du Pérou pour soigner la "fièvre des marécages", permettent à Pierre Joseph Pelletier et Joseph Bienaimé Caventou en 1820 d'en isoler l'alcaloïde actif, la quinine. Peu avant la seconde guerre mondiale, la chloroquine, 1^{er} antipaludique de synthèse, est préparée et ouvre la voie à toute une série de dérivés [Gentilini M *et al.*, 1993]. Contre le vecteur, les insecticides de contact à effet rémanent sont dès la fin de la guerre largement utilisés. Cela permet à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) d'entreprendre une campagne d'éradication du paludisme dès 1957. Si cette campagne est un succès dans les zones tempérées, les pays développés et les îles, il en est autrement dans les pays tropicaux [Greenwood B *et al.*, 2002]. Bien avant les années 1960, la résistance des vecteurs aux insecticides apparaît et en 1961 sont découvertes des souches de *P. falciparum* résistantes aux amino-4-quinoléines (antipaludiques de synthèse) [Benazet F, 1965].

Face à la recrudescence du paludisme due à toutes ces formes de résistances (contre les insecticides et antipaludiques), l'OMS met en place le programme "faire reculer le paludisme" (Roll Back Malaria) en mai 1998. Il a pour objectif de réduire de moitié le nombre de morts dus au paludisme en l'an 2010 [Site web rbm.who.int].

Actuellement les travaux de recherche sont orientés prioritairement vers :

- le développement d'un vaccin

Trois types de vaccins ayant pour cible le sporozoïte, le mérozoïte ou le gamétocyte, sont à l'étude. Les vaccins anti-sporozoïtes et/ou dirigés contre les stades hépatiques, sont conçus pour empêcher le développement des stades sanguins et ainsi prévenir l'infection. Les vaccins contre les stades sanguins asexués (mérozoïtes) visent à atténuer les manifestations graves et

compliquées de la maladie. Les vaccins contre les stades sexués (gamétocytes) sont conçus pour arrêter le développement du parasite dans le moustique et pour ainsi réduire ou arrêter la transmission de la maladie [Richie TL *et al.*, 2002].

- le traitement curatif et prophylactique

Les industries pharmaceutiques s'attachent à la fabrication de nouvelles molécules efficaces contre les souches résistantes de *P. falciparum*, et d'antipaludiques à visée exo-érythrocytaire. A cet effet, la Fondation "Medicines for Malaria Venture (MMV)" qui est une initiative mixte du secteur public et du secteur privé, a été créée à Genève en 1998. Elle se consacre à la réduction du paludisme en zone tropicale, à travers la découverte, le développement et la distribution de nouveaux médicaments [Site web mmv.org].

- la lutte antivectorielle

Il est à noter la mise au point de nouveaux outils de lutte antipaludique tels que les moustiquaires et les rideaux imprégnés d'insecticides. Il existe aussi un projet visant à interrompre la migration du parasite depuis l'intestin du moustique vers la salive, endroit où il devient infectieux pour l'être humain [Greenwood B *et al.*, 2002; Hoffman SL *et al.*, 2002].

1-1-2. Eléments de biologie

Le paludisme sévit principalement dans la ceinture de pauvreté du globe terrestre qui recouvre les zones tropicales et intertropicales. Sur le continent africain, le paludisme est rare en Afrique du Nord où l'on rencontre les espèces *P. vivax* et *P. malariae*. Il est très largement répandu dans toute l'Afrique intertropicale où coexistent *P. falciparum* (75 à 90%), *P. malariae* et *P. ovale*. Des quatre espèces plasmodiales infectant l'homme, *P. falciparum* est la plus pernicieuse car elle peut provoquer une issue fatale. Elle est aussi la plus largement répandue, mais dans les régions chaudes seulement car le développement de son cycle chez le moustique nécessite une température minimale de 18°C [Gentilini M *et al.*, 1993].

Les insectes vecteurs du paludisme sont des moustiques Culicidés de la sous-famille des Anophélinés. Les femelles d’anophèles, dont on compte une soixantaine d’espèces vecteurs potentiels, assurent seules la transmission du paludisme d’homme à homme et sont hématophages.

Le cycle du *Plasmodium* est réparti entre 2 hôtes. Il peut être subdivisé en 3 étapes, anophélienne, humaine exo-érythrocytaire et humaine érythrocytaire (Figure 1).

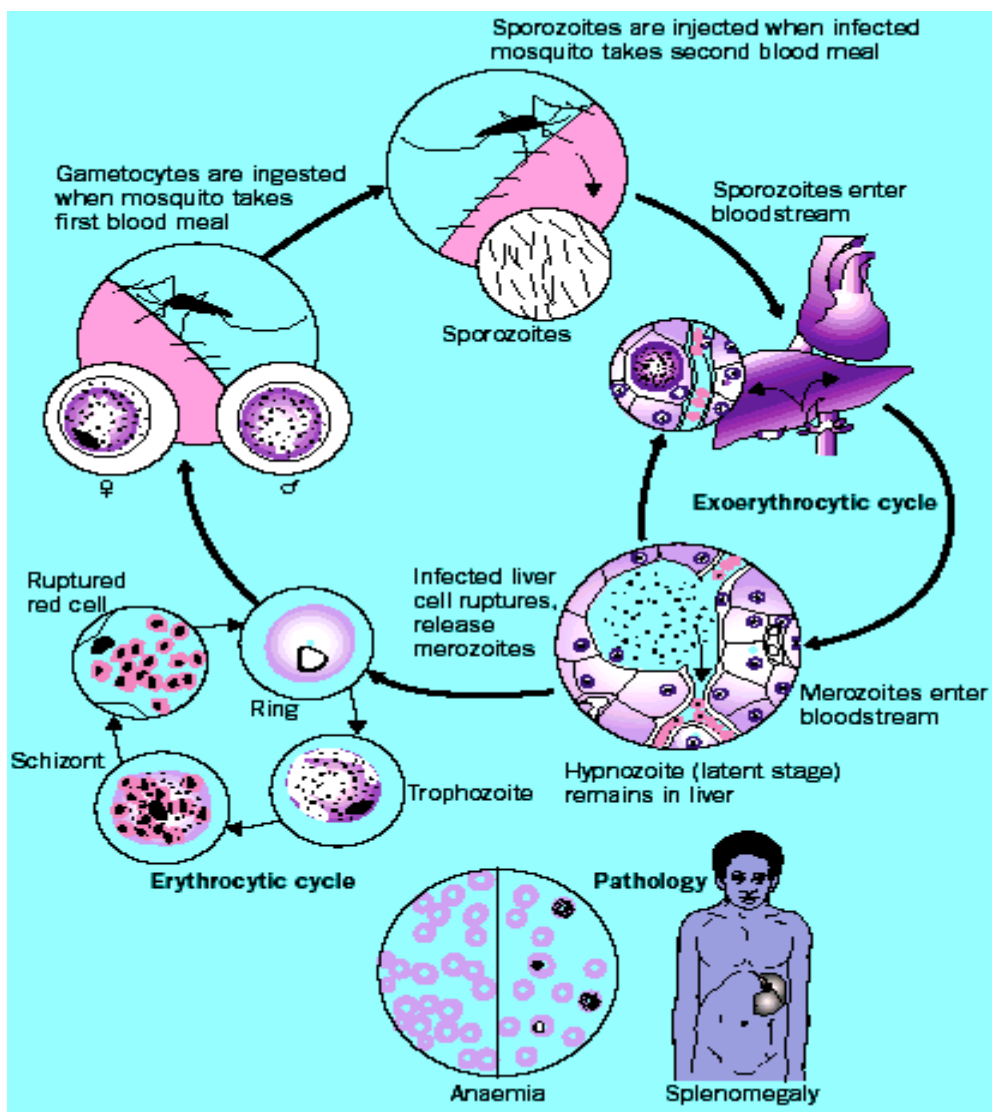


Figure 1: Cycle évolutif de *Plasmodium falciparum* [Extrait de Malaguarnera L *et al.*, 2002]

L'infection par le *Plasmodium* chez l'homme, commence par l'inoculation de sporozoïtes fusiformes par un anophèle infesté. Ces sporozoïtes transitent en une demi-heure dans le sang circulant et pénètrent activement dans le foie où s'effectue une schizogonie tissulaire primaire (cycle exo-érythrocytaire). Récemment, il a été montré *in vitro* que les sporozoïtes ayant franchi la barrière des cellules de Kupffer, traversent le cytoplasme de plusieurs hépatocytes avant d'en infecter dans un processus conduisant à la transformation en schizonte hépatique [Mota MM *et al.*, 2001]. L'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes implique l'intervention de co-récepteurs présents dans le domaine thrombospondine des protéines CSP (Circumsporozoite protein) et TRAP (Thrombospondin-related adhesive protein) de ces sporozoïtes [Miller LH *et al.*, 2002]. Ces co-récepteurs se lient spécifiquement aux glycoprotéines héparine sulfate (HSPG) de la membrane des hépatocytes [Frevert U *et al.*, 1993].

Après éclatement, chaque schizonte libère des dizaines de milliers de mérozoïtes qui gagnent le sang périphérique et infectent les érythrocytes avec, successivement, des stades de trophozoïtes, schizontes et corps en rosace. Finalement chaque corps en rosace libère plus d'une vingtaine de mérozoïtes qui vont à nouveau infecter des hématies (cycle asexué érythrocytaire). Un petit nombre de mérozoïtes se différencient en gamétocytes femelle et mâle qui vont se retrouver dans l'estomac du moustique et évoluer en gamètes femelle et mâle. Leur fécondation donne un ookinète qui va se fixer et devenir un oocyste (cycle sexué). L'éclatement de l'oocyste libère des sporozoïtes qui gagnent les glandes salivaires de l'anophèle, d'où ils seront inoculés à un nouvel hôte à l'occasion du prochain repas sanguin. Dans le cycle de l'espèce plasmodiale *P. vivax*, l'apparition de gamétocytes a lieu dès le début du cycle érythrocytaire. Cela entraîne la transmission de *P. vivax* de l'homme à l'anophèle avant l'apparition des signes cliniques chez l'humain [Miller LH *et al.*, 2002].

1-1-3. Physiopathologie

La découverte de mérozoïtes dans le sang signe l'existence d'une infection palustre. Cependant, c'est l'expulsion des mérozoïtes lors de la rupture des corps en rosace qui est à l'origine des signes cliniques du paludisme. Le développement de mérozoïtes en gamétocytes n'a aucune répercussion clinique sur l'infection palustre [Miller LH *et al.*, 2002]. Toute la pathogenèse du paludisme est déterminée à partir de l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes. Le mécanisme d'invasion de ces globules rouges, est un processus complexe à plusieurs étapes:

- la liaison réversible des ligands des mérozoïtes avec les récepteurs des érythrocytes
- la réorientation du pôle apical du mérozoïte, le mettant en contact avec la surface de l'hématie
- la formation irréversible de la jonction entre le pôle apical du mérozoïte et la membrane du globule rouge
- et enfin l'entrée du mérozoïte dans la vacuole parasitophore [Dvorak JA *et al.*, 1975; Aikawa M *et al.*, 1978].

Le début de l'invasion des hématies par les mérozoïtes, fait l'objet d'intenses recherches dont la stratégie est de la bloquer. La nature exacte des molécules impliquées dans l'invasion des globules rouges reste à définir. Néanmoins 2 grandes familles de protéines parasitaires sont décrites:

- la famille DBL (Duffy binding-like)

Ce sont, entre autres, les protéines des mérozoïtes de *P. vivax* qui se lient aux antigènes du groupe sanguin Duffy des hématies, mais aussi la protéine parasitaire EBA-175 (erythrocyte-binding antigen) qui elle se lie au récepteur Glycophorine A de l'érythrocyte.

- la famille RBL (Reticulocyte binding-like)

On y compte l'hétérodimère RBL1/RBL2 présent chez *P. vivax* et qui se lie aux réticulocytes, mais aussi la protéine RBL1 de *P. falciparum* qui se lie aux récepteurs Trypsine-résistants et Neuraminidase-sensibles [Miller LH *et al.*, 2002].

Deux aspects du processus d'invasion des hématies ont un impact décisif sur la pathogenèse de l'infection palustre. L'invasion peut concerner tous les érythrocytes ou seulement une sous-population, avec la possibilité d'une issue fatale uniquement pour le premier cas. L'invasion peut aussi se produire par le biais d'une seule voie (cas de *P. vivax* utilisant seulement les antigènes Duffy) ou alors, elle peut avoir lieu en recrutant toutes les voies possibles (cas de *P. falciparum*) [Miller LH *et al.*, 1994].

Le tableau clinique résultant de l'invasion des hématies dépend à la fois du parasite (espèce plasmodiale et densité parasitaire) et de l'hôte (réceptivité génétique et état immunitaire). Ce tableau se décline en 3 grands types d'infection palustre : asymptomatique (absence de signes cliniques), simple et sévère. Nous allons les aborder suivant un ordre établi en fonction de la densité des signes cliniques et nullement en fonction de leur prévalence.

1-1-3-1. Infection plasmodiale ou palustre asymptomatique

Cette infection est définie comme un parasitisme sanguin sans manifestations cliniques. Chez des sujets vivant en zones de forte endémie palustre, ce type de portage asymptomatique de *Plasmodium* est fréquemment observé et peut atteindre 90% des adultes. La durée et le nombre d'infections palustres asymptomatiques en zone d'endémie sont fonctions de l'âge, et ces infections supposent la mise en place d'immunité acquise [Franks S *et al.*, 2001; Smith T *et al.*, 1999]. La durée d'une infection asymptomatique peut atteindre 1 an pour *P. falciparum* et 3 ans pour *P. malariae* [Covell G, 1960].

L'infection palustre asymptomatique s'interrompt vraisemblablement à la suite d'une rupture de l'équilibre entre la virulence du parasite et la réponse immunitaire de l'hôte. C'est cet équilibre qui maintient la densité parasitaire en dessous d'un seuil limite dit seuil pyrogénique. Ce seuil pyrogénique est défini comme la densité parasitaire moyenne limite (en nombre de parasites par μL de sang) au-delà de laquelle les manifestations cliniques apparaissent. La valeur du seuil pyrogénique qui matérialise la relation entre la densité parasitaire et les manifestations cliniques, varie en fonction de l'âge et de l'endémicité. Cette valeur est donc spécifique à chaque zone d'étude et a le mérite d'être utilisable pour distinguer un accès fébrile palustre d'une fièvre d'origine non-palustre [Rogier C *et al.*, 1996]. Il est à noter que la densité parasitaire est mesurée à partir du sang périphérique et que par conséquent, elle ne tient pas compte de la séquestration éventuelle des parasites dans les tissus profonds.

L'apport des techniques de biologie moléculaire en terme de seuil de détection (10 à 100 fois plus sensible que la lecture en microscopie optique) a permis de révéler une part non négligeable d'infections asymptomatiques [Bottius E *et al.*, 1996]. Les techniques de biologie moléculaire ont aussi mis en évidence les infections multiples et les co-infections. Les infections multiples sont définies comme des infections palustres par plusieurs clones de la même espèce alors que les co-infections se caractérisent par des infections initiées par des parasites issus de plusieurs espèces de *Plasmodium*. Plusieurs études ont montré que le nombre de clones parasitaires c'est-à-dire la multiplicité de l'infection, est davantage associé à l'infection asymptomatique qu'à l'infection symptomatique palustre [Ntoumi F *et al.*, 1997; Al-Yaman F *et al.*, 1997; Farnert A *et al.*, 1999]

1-1-3-2. Infection palustre simple ou Paludisme simple

Le paludisme est l'infection palustre devenue maladie, il est donc défini par la présence de parasites et de symptômes cliniques. Concernant le paludisme simple, les symptômes sont communément une pyrexie (fièvre), des frissons accompagnés de sueurs et des céphalées. En dehors de ces symptômes classiques, des manifestations atypiques peuvent également apparaître, myalgies, douleurs articulaires, asthénie, amaigrissement, syndromes pseudo-grippaux, légers vomissements ou diarrhées, syndrome inflammatoire et splénomégalie. La fièvre peut s'installer en mode continu ou intermittent, singularisant ainsi deux sortes d'accès palustres simples:

- Accès de primo-invasion

Il apparaît chez un sujet "neuf", non immun (enfant de 4 mois à 4 ans, adultes expatriés et Africains de métropoles africaines). C'est une fièvre progressivement croissante qui devient continue en plateau ou à grandes oscillations irrégulières avec plusieurs pics journaliers atteignant 39-40°C.

- Accès à fièvre périodique

Cet accès intermittent correspond à un accès de reviviscence schizogonique par "réveil" d'un hypnozoïte intra-hépatique ou par exacerbation d'une schizogonie sanguine latente. Il peut suivre immédiatement un accès de primo-invasion dans le cas d'infections par *P. falciparum*. Chaque cycle de fièvre se caractérise généralement par la succession de 3 stades, frissons-chaleurs-sueurs. Le rythme des fièvres est variable selon l'espèce plasmodiale:

· Tous les 2 jours, lorsque la schizogonie est de 48 heures, c'est la fièvre tierce observable avec *P. vivax*, *P. ovale* et *P. falciparum*

· Tous les 3 jours, lorsque la schizogonie est de 72 heures, c'est la fièvre quarte visible pour une infection avec *P. malariae* [Gentilini M *et al.*, 1993].

La fièvre est due à la rupture des schizontes qui libère un pigment malarique (hémozoïne) et des molécules solubles parasitaires (toxines malariques). Il a d'abord été admis que l'hémozoïne, dont le rôle exact est toujours inconnu, provoquait la fièvre car elle agirait secondairement sur les centres bulbaires de la thermorégulation [Gentilini M *et al.*, 1993]. Aujourd'hui, on considère que la cause majeure de la fièvre est déterminée par les toxines malariques qui induisent la sécrétion de diverses cytokines (en particulier le facteur α de nécrose des tumeurs ou TNF- α) par les macrophages [Kwiatkowski D *et al.*, 1989; Playfair JH *et al.*, 1990]. Différentes molécules ont été proposées pour définir ces toxines malariques, y compris le glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) et il a été montré que certains extraits parasitaires induisaient de hautes concentrations de TNF- α [Allan RJ *et al.*, 1993]. Le TNF- α qui provoque donc la réaction inflammatoire peut aussi être produit par d'autres cellules telles que les monocytes, à la suite de l'intervention des cellules T stimulées par les antigènes plasmodiaux [Miller LH *et al.*, 1994].

1-1-3-3. Infection palustre sévère ou Paludisme grave

Le paludisme sévère correspond à la forme clinique de l'infection pouvant entraîner une issue fatale, il est essentiellement provoqué par l'espèce plasmodiale *P. falciparum*. En terme de proportions, on considère que sur 400 sujets piqués par des anophèles infestés, 200 développeront une infection asymptomatique et 100 un paludisme dont 98 présenteront une infection simple et 2 subiront une infection sévère entraînant la mort de l'un des 2 sujets [Ambroise-Thomas P *et al.*, 1992].

La définition d'un paludisme grave, donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) montre une densité parasitaire supérieure à 250000 parasites/ μ L de sang (soit 5% d'hématies parasitées). En outre, y sont incluses 3 manifestations majeures (coma stade II ou plus, crises convulsives généralisées et hémoglobine $<5-6$ g/dl) pouvant chacune permettre de conclure à

un paludisme sévère au sens strict. Les manifestations cliniques permettent de distinguer deux formes graves de paludisme dont les mécanismes sont complètement distincts, le paludisme cérébral et l'anémie palustre sévère. Toutefois, il existe un trait physiopathologique unique au travers de ces deux formes sévères, il s'agit d'acidose métabolique importante qui est généralement une acidose lactique [Miller LH *et al.*, 2002].

- Le paludisme cérébral ou Neuro-paludisme

Le paludisme cérébral est caractérisé principalement par un coma de stade II et plus ou par des crises convulsives généralisées et répétées. Il entraîne la mort d'un nombre élevé de patients chez les sujets non immuns et chez les enfants africains. En Afrique, son incidence enregistre un pic chez les enfants de 3 à 4 ans dans les régions hypo-endémiques. Dans ces régions de faible endémicité, cette forme de paludisme est prédominante par rapport à l'anémie sévère [Marsh K, 1992].

La pathogenèse du paludisme cérébral est expliquée en partie par l'obstruction de la micro-circulation capillaire (phénomène de séquestration) qui est provoquée par la diminution de la déformabilité des érythrocytes parasités. Mais l'explication majeure reste la cyto-adhérence des érythrocytes parasités [Ambroise-Thomas P *et al.*, 1992].

Afin d'éviter d'être éliminé par l'organisme humain, le parasite modifie en permanence la surface des hématies parasitées, leur permettant d'adhérer aux cellules de l'endothélium vasculaire, mais aussi aux hématies non parasitées (formation de rosettes). La cyto-adhérence peut varier dans des proportions considérables selon les souches plasmodiales et requiert la liaison entre adhésines plasmodiales et récepteurs cellulaires [Miller LH *et al.*, 2002]. Les knobs sont des protubérances d'origine parasitaire présentes à la surface d'hématies parasitées. Ce sont des zones de contact avec l'endothélium vasculaire, où se manifeste le phénomène de cyto-adhérence [Miller LH *et al.*, 1994].

Dans le paludisme cérébral, le phénomène de cyto-adhérence serait provoqué suite à la sur-expression des molécules de liaison, principalement de l'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), par l'endothélium vasculaire cérébral, et cette sur-expression serait induite par les cytokines dont majoritairement le TNF- α [Miller LH *et al.*, 1994].

- L'anémie palustre sévère

Elle est définie par l'OMS comme une anémie grave avec un taux d'hémoglobine <5g/dl ou un hématoците <15% en présence d'une parasitémie >10000 parasites/ μ L. Compte tenu de la variabilité de la parasitémie en fonction de l'âge et du niveau d'endémicité, l'anémie palustre est en pratique décrite quand le taux d'hémoglobine est <11g/dl lors d'une infection palustre chez les nourrissons, les enfants et les femmes enceintes, ou <13g/dl lors d'une infection par *Plasmodium* chez les femmes non-enceintes et les hommes [Nussenblatt V *et al.*, 2002].

Dans les régions d'endémicité palustre élevée, l'anémie palustre sévère est la forme grave la plus répandue du paludisme à *P. falciparum*. Dans une étude en Zambie, il a été observé une fréquence double d'anémie palustre sévère comparativement au paludisme cérébral [Biemba G *et al.*, 2000]. Dans ces régions hyper-endémiques, l'anémie palustre sévère est associée à un taux de mortalité élevé [Brabin BJ *et al.*, 2001].

Le mécanisme de l'anémie palustre sévère suggère une destruction des érythrocytes et une baisse de leur production. Les causes potentielles de l'hémolyse comprennent la rupture et la phagocytose des hématies parasitées, ainsi que la perte d'hématies saines suite à une sensibilisation aux anticorps ou à des changements physico-chimiques de la membrane [Phillips RE *et al.*, 1992]. La chute de la production d'hématies serait causée par une hypoplasie médullaire (développement insuffisant de la moelle) et par un dysfonctionnement de l'érythropoïèse induisant sa suppression [Abdalla S *et al.*, 1980; Phillips RE *et al.*, 1992].

En induisant la libération des cytokines telles que le TNF- α , la réponse immune de l'hôte humain "face" aux parasites, entraînerait par l'intermédiaire de ces molécules pro-inflammatoires, la détérioration de l'hématopoïèse [Clark IA *et al.*, 1988; Miller LH *et al.*, 1994].

Remarque 1: Endémicité

L'endémicité d'une région peut-être définie par l'indice plasmodique (IP). Ce dernier représente le pourcentage de sujets présentant des hématozoaires dans le sang. L'IP des enfants de moins de 10 ans, permet de classer les régions selon l'endémicité, en 4 types:

- IP < 25%, région hypo-endémique
- $25\% \leq \text{IP} < 50\%$, région méso-endémique
- $50\% \leq \text{IP} < 75\%$, région hyper-endémique
- $\text{IP} \geq 75\%$, région holo-endémique

Il est intéressant d'évaluer l'indice plasmodique des enfants de moins de 1 an, car il permet d'apprécier la fréquence des infections récentes.

Remarque 2: Infections mixtes ou co-infections

Les infections palustres mixtes généralement observées à une prévalence faible par lecture de lames, sont en réalité détectées à des proportions non négligeables en utilisant des méthodes moléculaires d'analyses (par exemple en Papouasie Nouvelle Guinée) [Mehlotra RK *et al.*, 2000]. Des études statistiques ont permis de montrer "l'indépendance" des 4 espèces plasmodiales quant à la survenue d'une infection palustre chez l'homme [Mehlotra RK *et al.*, 2000]. En tenant compte de la prévalence individuelle de chaque espèce, il a été observé que les infections mixtes à *P. falciparum*/*P. vivax* avaient une prévalence plus faible

que celle prévue statistiquement, alors que cette baisse relative n'est pas visible pour les infections mixtes à *P. falciparum*/*P. malariae* [McKenzie FE *et al.*, 1997].

Il semblerait que le moment auquel le parasite infecte les hématies, soit une donnée déterminante dans les infections mixtes. L'infection par une deuxième espèce plasmodiale (*P. vivax*, *P. malariae* ou *P. ovale*) à la suite d'une infection existante à *P. falciparum*, entraînerait des densités parasitaires élevées [Molineaux L *et al.*, 1980]. Par contre, il est observé une réduction de la parasitémie de 50% dans le cas d'une infection à *P. falciparum* qui surviendrait pendant une infection à *P. malariae* chez le même sujet [Mason DP *et al.*, 1999]. De même, la sévérité d'une infection à *P. falciparum* est atténuée lorsque celle-ci intervient pendant une infection à *P. vivax* [Luxemburger C *et al.*, 1997]. Enfin, l'infection à *P. falciparum* masque l'infection à *P. ovale* conjointe, suggérant un effet d'immunosuppression exercé contre cette dernière [Faye FB *et al.*, 2002].

1-2. FACTEURS INFLUENÇANT L'INFECTION PALUSTRE

Après avoir noté des généralités sur les différents groupes de facteurs et décrit les facteurs génétiques non concernés par notre travail, nous allons nous appesantir sur la situation actuelle de chacun des facteurs étudiés.

1-2-1. Différents types de facteurs

Trois grands groupes de facteurs influencent le cours de l'infection par les espèces plasmodiales [Miller LH *et al.*, 2002].

1-2-1-1. Facteurs parasitaires

Parmi ces facteurs liés au *Plasmodium*, on dénombre dans un ordre aléatoire :

1. Le taux de multiplication du parasite

Le taux de multiplication des espèces plasmodiales est déterminé par l'efficacité de l'invasion des hématies par les mérozoïtes plutôt que par la "clairance" des érythrocytes parasités circulants [White NJ *et al.*, 1992].

2. Le polymorphisme antigénique de l'espèce plasmodiale

Ce polymorphisme est observable grâce aux techniques moléculaires qui ont permis de caractériser différentes souches en identifiant les allèles existant pour différents loci. On a pu ainsi observer l'existence de différentes familles alléliques chez les plasmodies selon les régions géographiques [Creasey A *et al.*, 1990].

3. La variation antigénique des protéines parasitaires

Un exemple type est représenté par les protéines PfEMP (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1). Elles sont exprimées à la surface des hématies parasitées et entraînent normalement une réponse immunitaire dont la conséquence est la destruction des érythrocytes parasités. Mais ces protéines sont codées par une famille de 40 à 50 gènes très polymorphes

(les gènes var) dont un seul au départ est transcrit par le parasite [Miller LH *et al.*, 2002]. Ensuite le taux de renouvellement est de l'ordre de 2%, entraînant des variations antigéniques continues qui permettent aux hématies parasitées d'éviter la destruction [Baruch DI *et al.*, 1995; Smith JD *et al.*, 1995; Scherf A *et al.*, 1998].

4. La nature des toxines malariques
5. Les différentes voies d'invasion des hématies
6. Le phénomène de cyto-adhérence
7. Le phénomène d'agglutination en rosace (rosetting)
8. La résistance aux molécules anti-paludiques

Concernant la résistance *in-vitro* des isolats de *P. falciparum* à Libreville (Gabon), elle a été observée de manière accrue à l'amodiaquine (100%) et à l'halofantrine (98%), et de façon décroissante à l'artemether (14%), à la chloroquine (90%) et à la quinine (32%) [Pradines B *et al.*, 1998].

1-2-1-2. Facteurs socio-géographiques

Ces facteurs prennent en compte sans ordre établi :

a) L'intensité de la transmission

Des conditions climatiques favorables, permettent une espérance de vie et une densité élevées des insectes vecteurs et *in fine* une transmission pérenne. Les gîtes larvaires, définis comme tous points d'eau stagnante non polluée, du marécage à la petite mare jusqu'aux citernes des zones urbaines, influencent la transmission des parasites en fonction de leur proximité [Trape JF *et al.*, 1992]. L'intensité de la transmission est définie par le taux d'inoculation entomologique (EIR) qui est le nombre de piqûres infestées reçues par un sujet témoin par unité de temps. Le taux d'inoculation a été associé de façon inversement proportionnelle au niveau d'urbanisation des villes en Afrique sub-saharienne [Robert V *et al.*, 2003].

b) L'accès au traitement (zones reculées)

c) Les données socio-économiques

L'activité humaine (habitudes alimentaires, rites traditionnels, etc...) a une influence directe sur l'interaction homme/vecteur parasitaire. L'élevage domestique par exemple peut constituer un facteur limitant l'exposition de l'homme car certains anophèles sont à la fois anthropophiles et zoophiles. Il a été observé à Franceville (Gabon), que la présence de primates non-humains dans l'environnement des humains limitait la transmission de *P. falciparum* chez ces derniers [Ollomo B *et al.*, 1997]. La structure et la nature des constructions constituent aussi un facteur réduisant l'introduction des anophèles [Koram KA *et al.*, 1995].

d) La stabilité politique (guerres, génocides).

1-2-1-3. Facteurs de l'hôte

Les facteurs liés à l'hôte figurent avec ceux liés aux parasites comme les paramètres les plus déterminants. Dans un ordre non déterminé, on compte :

a) L'âge

Les différences de profils cliniques entre des accès graves à *P. falciparum* chez l'enfant et chez l'adulte (Tableau 1) illustrent l'influence exercée par l'âge sur l'infection palustre. Dans les régions endémiques, il existe une relation entre l'âge et la nature de la forme grave du paludisme. Les enfants entre 6 mois et 2 ans, présentent comme complication majeure du paludisme, l'anémie palustre sévère [Beales PF *et al.*, 1997], alors que les enfants en âge préscolaire entre 3-4 ans, ont une survenue du paludisme cérébral plus fréquente [Phillips RE *et al.*, 1992]. Dans plusieurs études, Ekala *et al.* ont montré une dépendance entre l'âge et la complexité (nombre moyen des génotypes parasitaires par sujet infecté) des infections à *P. falciparum* [Ekala M-T *et al.*, 2002 Jan; Ekala M-T *et al.*, 2002 Aug].

Caractéristiques cliniques	Enfants	Adultes
Début avec toux	Fréquent	Rare
Durée de la phase pré-berneuse	Courte (1-2 jours)	Moyenne (>2 jours)
Convulsions	Fréquentes	Moins fréquentes
Ictère	Rare	Fréquent
Parasitémie initiale	Elevée (>500000/mm ³)	Variable (5000 à 100000 mm ³)
Hypoglycémie	Fréquent	Rare
Insuffisance rénale organique	Rare	Fréquent
Œdème pulmonaire	Rare	Moins rare
Durée du coma sous traitement	Brève (1-2 jours)	Longue (2-4 jours)
Séquelles neurologiques	Possibles (10% des cas)	Rares

Tableau 1: Différences cliniques entre accès graves à *P. falciparum* chez l'enfant et chez l'adulte [Extrait de Molyneux ME *et al.*, 1990]

b) La prémunition

La prémunition, terme inventé par E. Sergent en 1924, décrivait une situation où la protection contre le paludisme reposait sur le maintien d'une infection palustre minimale (par infection résiduelle chronique ou par exposition permanente aux plasmodies) [Sergent E, 1924]. Ce terme désigne aujourd'hui, l'immunité protectrice naturellement acquise contre le paludisme. Bien que souvent décrite dans les zones hyper-endémiques en Afrique, la prémunition est également présente dans les zones de faible endémicité en Asie [Soe-Soe *et al.*, 2001]. Elle est dirigée contre le cycle érythrocytaire du *Plasmodium* et non pas contre l'infection par les sporozoïtes (cycle hépatique). Elle joue ainsi un rôle déterminant dans la réduction de la pathologie palustre (signes cliniques) dans les zones endémiques. La prémunition s'exprime au niveau de l'aspect anti-toxique de l'immunité anti-palustre, ce qui expliquerait l'absence de symptômes cliniques qu'elle entraîne [Hommel M *et al.*, 1996].

c) Les cytokines pro-inflammatoires

Des concentrations plasmatiques élevées de cytokines ont été observées lors du diagnostic des infections palustres sévères mais aussi lors d'accès palustres simples [Baptista JL *et al.*, 1997]. Et de nombreuses études ont montré des associations entre les cytokines (TNF- α , IL-6, IL-10 et INF- γ) et le profil clinique de l'infection palustre.

d) L'état de grossesse

La prophylaxie contre l'infection palustre chez les femmes enceintes dans les régions endémiques est essentielle car ces femmes sont particulièrement susceptibles à l'infection par les plasmodies durant leur grossesse. En effet par rapport aux femmes non-enceintes, elles présentent fréquemment une parasitémie plus élevée, qui renforcée par des déficiences nutritionnelles, augmente leur susceptibilité à l'anémie palustre sévère [Nussenblatt V *et al.*, 2002]. Il a été également observé que durant la première et la deuxième grossesse, les femmes enceintes vivant en zone endémique, présentaient des densités parasitaires élevées [Brabin BJ,

1983]. Ainsi, malgré la prémunition palustre chez ces femmes, l'espace vasculaire utéro-placentaire demeure un site propice à la séquestration et au développement des parasites, expliquant des parasitémies localement élevées chez ces femmes [McGregor IA *et al.*, 1983; Miller LH *et al.*, 1994; Miller LH *et al.*, 2002].

e) Les caractéristiques génétiques

Les travaux de recherches assez récents sur les facteurs génétiques peuvent être répartis en deux groupes complémentaires selon les profils cliniques de l'infection palustre pris en compte :

i. Les études dites "qualitatives"

Ces études prennent en compte les caractères cliniques qualitatifs, infection palustre asymptomatique, paludisme simple, paludisme cérébral ou anémie palustre sévère. Les méthodes d'épidémiologie génétique utilisées pour explorer l'influence des caractéristiques génétiques sur l'expression de ces différentes formes d'infections palustres, reposent sur les études cas-témoins. Ces dernières utilisent les tests d'association qui comparent la fréquence de polymorphismes génétiques chez des sujets atteints et chez des sujets témoins, tous non apparentés. Ces tests d'association ont permis de révéler les liaisons entre des gènes d'intérêt et les formes de l'infection palustre, principalement les formes graves. Ces différents gènes étudiés peuvent être regroupés en 2 entités :

- Le premier groupe de gènes décrits renferment des gènes impliqués dans la physiologie des globules rouges, et le premier d'entre eux a été identifié en 1954 par A. C. Allison comme un gène de résistance à l'infection par *P. falciparum* [Allison AC, 1954]. Tous ces variants érythrocytaires sont considérés comme réfractaires, au moins en partie, à la pénétration et/ou au développement des plasmodies dans les hématies [Nagel RL *et al.*, 1989]. Ils sont responsables de pathologies, en majorité des hémoglobinopathies, parmi lesquelles on recense la drépanocytose, l'ovalocytose, les

hémoglobinoses C et E, les thalassémies et la déficience en glucose-6-phosphate deshydrogénase. Sont également considérés comme facteurs de résistance/susceptibilité, les variants érythrocytaires en rapport avec les récepteurs membranaires définissant les systèmes de groupes sanguins ABO et Duffy.

- Le second groupe de gènes révélés par les études d'associations, concerne des gènes impliqués dans la réponse immune contre les infections palustres. On y distingue des gènes de la région p21 du chromosome 6 tels que ceux du TNF- α et des antigènes du système HLA (human leucocyte antigen), mais aussi d'autres gènes codant pour le récepteur endothélial ICAM-1 et pour l'enzyme synthase de l'oxyde nitrique inductible (iNOS ou NOS2).

ii. Les études dites "quantitatives"

Ces études s'effectuent autour des critères cliniques quantitatifs que sont la charge parasitaire sanguine et le nombre d'accès palustres. Ces critères donnent des indications sur le niveau d'infection par les plasmodies et sur la réponse immune. Les méthodes d'épidémiologie utilisées ici, appartiennent aux études familiales qui comptent principalement des analyses de liaison génétique et certaines analyses d'association. Les analyses de liaison génétique cherchent à localiser une région chromosomique présentant une ségrégation non-indépendante du phénotype étudié. C'est ainsi qu'une étude menée au Burkina-Faso sur 34 familles, a montré l'implication à 45% de la région 5q31-q33 dans le contrôle génétique de la charge parasitaire sanguine et de la réponse immune [Rihet P *et al.*, 1998]. Cette région chromosomique 5q31-q33, dont l'impact observé est plus important chez l'enfant que chez l'adulte, comprend de nombreux gènes candidats parmi lesquels ceux codant pour les interleukines-4, -13, -9, -3 et -12, pour les facteurs GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) et IRF-1 (interferon regulatory factor-1) et pour les récepteurs β 2 adrénergiques.

1-2-2. Facteurs génétiques

Les divers facteurs génétiques humains sont différemment répartis parmi les populations des régions endémiques palustres. Nous avons ici rappelé leur distribution et noté concernant leur implication dans l'infection palustre, des résultats quelques fois différents voire contradictoires.

1-2-2-1. La drépanocytose ou anémie falciforme

Cette affection génotypique répandue dans la race noire, est caractérisée par l'apparition d'une hémoglobine particulière, l'hémoglobine S, qui diffère de l'hémoglobine A par le remplacement du 6^{ème} acide aminé (acide glutamique) de sa chaîne β par la valine. Quatre principaux foyers ont été retrouvés avec des fréquences du trait drépanocytaire dépassant les 20% dans les pays du golfe du Bénin et d'Afrique centrale, et des fréquences plus basses dans les deux autres foyers sénégalais et arabo-indien [Lapoumèroulie C *et al.*, 1992].

Affection létale à l'état homozygote, la drépanocytose illustre par sa fréquence élevée, la pression sélective exercée par l'infection palustre sur les populations des régions tropicales. La protection contre les formes sévères du paludisme conférée par le portage de l'hémoglobine S, a été évaluée à plus de 90% chez les enfants hétérozygotes AS dans une étude réalisée en Gambie [Hill AV *et al.*, 1991]. Concernant le paludisme simple, l'hémoglobine S à l'état d'hétérozygotie chez les enfants de moins de 7 ans, a été associée à une diminution du risque d'accès simple de paludisme [Allen SJ *et al.*, 1992].

L'impact du trait drépanocytaire sur le niveau de la charge parasitaire sanguine a été analysé dans plusieurs études révélant des résultats dissemblables. Une partie des études réalisées par "coupes transversales" a montré une association entre le trait drépanocytaire et la réduction de

la densité parasitaire [Flemming AF *et al.*, 1979; Lell B *et al.*, 1999; Stirnadel HA *et al.*, 1999]. D'autres études par contre, n'ont point décelé cette association [Olumese PE *et al.*, 1997; Bienzle U *et al.*, 1981]. Plusieurs études longitudinales, quant à elles, ont révélé que la densité parasitaire était sous le contrôle génétique de la région q31-q33 du chromosome 5 [Garcia A *et al.*, 1998; Rihet P *et al.*, 1998].

Si l'effet protecteur contre les infections palustres graves conféré par le trait drépanocytaire est acquis, il n'en demeure pas moins que le mécanisme de protection n'est pas complètement élucidé. Plusieurs hypothèses ont été évoquées, dont la falciformation des hématies parasitées entraînant leur phagocytose et la polymérisation de l'hémoglobine S devenant un substrat non adéquat pour les protéases de *P. falciparum* [Nagel RL *et al.*, 1989]. Depuis plus d'une dizaine d'années, un autre type de mécanisme proposé, situe l'effet protecteur de l'hémoglobine S au niveau de la modulation de la réponse immune en impliquant par exemple une acquisition précoce et efficace de l'immunité anti-parasitaire [Bayoumi RA *et al.*, 1987; Abu-Zeid YA *et al.*, 1992; Ntoumi F *et al.*, 1997].

1-2-2-2. L'ovalocytose (erythrocyte band 3)

L'ovalocytose est une anomalie héréditaire, létale à l'état homozygote. Elle est caractérisée par la forme rigide et ovale des érythrocytes dont la principale protéine transmembranaire (erythrocyte band 3) est structurellement et fonctionnellement anormale [Liu SC *et al.*, 1990]. Localisée principalement en Asie du Sud-Est, l'ovalocytose est consécutive à un défaut moléculaire dû à la délétion de 9 acides aminés de la protéine erythrocyte band 3, affectant ses propriétés de glycosylation et d'inhibiteur de liaison [Jarolin P *et al.*, 1991; Sarabia VE *et al.*, 1993].

Outre le fait que les ovalocytes (érythrocytes affectés par l'ovalocytose) opposent *in vitro*, une résistance à l'invasion par les plasmodies, il a été observé que les réponses

immunes contre les antigènes de la bande 3 d'hématies parasités par *P. falciparum* en zone hyper-endémique, étaient associées à une faible densité parasitaire et à un hémocrite élevé [Hogh B *et al.*, 1994; Kidson C *et al.*, 1981; Hadley T *et al.*, 1983]. Les résultats d'une étude chez les primates non-humains ont montré que les peptides synthétiques basés sur la protéine humaine erythrocyte bande 3, empêchaient les phénomènes de cyto-adhérence et de séquestration des érythrocytes parasités par *P. falciparum* [Crandall I *et al.*, 1993]. L'ovalocytose a également été associée en Papouasie-Nouvelle-Guinée, à une protection contre le paludisme cérébral mais avec un taux d'hémoglobine faible donc une susceptibilité accrue à l'anémie palustre [Allen SJ *et al.*, 1999].

1-2-2-3. L'hémoglobine C

C'est une hémoglobine transmise sur le mode autosomique co-dominant et originaire de l'Ouest africain, très probablement du plateau burkinabé, où la prévalence dépasse 15% [Gentilini M *et al.*, 1993]. Situé au même niveau que pour l'hémoglobine S, le défaut moléculaire de l'hémoglobine C correspond au remplacement du 6^{ème} acide aminé de la chaîne β (l'acide glutamique) par la lysine. Mais à l'inverse de la drépanocytose, le sujet homozygote CC ne présente guère de troubles si ce n'est une anémie modérée, une splénomégalie importante et de vagues douleurs articulaires et abdominales, quant au sujet hétérozygote AC, il est bien portant [Gentilini M *et al.*, 1993; Duflo B *et al.*, 1985].

Le rôle de l'hémoglobine C dans la susceptibilité/résistance à l'infection palustre a été longtemps l'objet de débats contradictoires. Tout d'abord les études *in vitro* ont montré l'inhibition de la croissance de *P. falciparum* dans les globules rouges ayant une hémoglobine CC, et précisément la réduction des formes parasitaires issues des schizontes [Friedman MJ *et al.*, 1979; Olson JA *et al.*, 1986]. Ensuite bon nombre d'études n'ont pas trouvé d'association entre l'hémoglobine C à l'état d'hétérozygotie et la résistance à l'infection par *P. falciparum*

(infections sévères ou densités parasitaires) [Storey J *et al.*, 1979; Guinet F *et al.*, 1997]. Enfin récemment, une étude a montré au Mali que l'hémoglobine C à l'état d'hétérozygotie est associée à une protection contre les formes sévères du paludisme [Agarwal A *et al.*, 2000]. Puis Modiano *et al.* ont observé dans une large étude de plus de 4000 sujets burkinabés que l'hémoglobine C est associée à une réduction du risque de paludisme de 29% chez les hétérozygotes (AC) et de 93% chez les homozygotes (CC) [Modiano D *et al.*, 2001]. Cette dernière étude laisse supposer le remplacement de l'hémoglobine S par l'hémoglobine C dans ces populations.

1-2-2-4. L'hémoglobinose E

Cette hémoglobinose est localisée en Asie du Sud-Est, notamment au Cambodge (où elle peut atteindre une fréquence de 40%), en Thaïlande, en Birmanie, au Sri Lanka, en Indonésie et en Malaisie [Gentilini M *et al.*, 1993]. L'hémoglobine E est différente de l'hémoglobine normale A au niveau du 26^{ème} acide aminé de la chaîne β où l'acide glutamique est remplacé par la lysine. Les homozygotes présentant 90 à 100% d'hémoglobine E, sont habituellement en bonne santé hormis une anémie modérée ou une pseudo-polyglobulie hypochrome et microcytaire, et les hétérozygotes sont asymptomatiques avec 30 à 50% d'hémoglobine E [Gentilini M *et al.*, 1993].

Les premières études épidémiologiques concernant l'impact de l'hémoglobine E sur le risque d'infection par les plasmodies, ont montré des résultats contradictoires [Flatz G *et al.*, 1965; Kruatrachue M *et al.*, 1969]. Les études suivantes centrées sur le développement des formes plasmodiales dans les érythrocytes E, ont aussi révélé des indications diverses [Nagel RL *et al.*, 1981; Santiyanont R *et al.*, 1981]. Une étude menée en Thaïlande, a enfin retrouvé une association entre la présence de l'hémoglobine E et la réduction de la sévérité du paludisme à *P. falciparum* [Hutagalung R *et al.*, 1999]. L'hémoglobine E permet à la majorité

des hématies d'être relativement résistantes à l'invasion par *P. falciparum* et par conséquent elle ne protégerait pas contre les infections palustres simples mais contribuerait à une protection contre les parasitémies élevées et les formes graves du paludisme [Chotivanich K *et al.*, 2002].

1-2-2-5. Les α - et β -thalassémies

Ce sont des affections génotypiques caractérisées par un déficit de production des chaînes α ou β de globine entraînant un trouble de la synthèse d'hémoglobines normales.

Les β -thalassémies sont les thalassémies les plus fréquentes. Elles se rencontrent sur tous les continents mais elles sévissent surtout sur le pourtour du bassin méditerranéen, en Extrême-Orient et en Afrique noire [Gentilini M *et al.*, 1993].

De nombreuses études ont montré chez les sujets β -thalassémiques, de possibles mécanismes de protection contre l'infection palustre, parmi lesquels la reconnaissance immune favorisée par l'expression des antigènes de surface des hématies thalassémiques parasitées, la réduction du transport d'adénosine dans les érythrocytes thalassémiques, l'inhibition de la formation de l'hémozoïne dans les trophozoïtes par des analogues de l'hème présents à un taux élevé dans les érythrocytes thalassémiques, et la baisse des phénomènes de cyto-adhérence et de formation en rosettes des hématies thalassémiques parasitées par *P. falciparum* [Luzzi GA *et al.*, 1991; Myint-Oo *et al.*, 1993; Martiney JA *et al.*, 1996; Udomsangpetch R *et al.*, 1993].

Les α -thalassémies, bien que présentes en Afrique noire, en Arabie Saoudite et en Europe, se rencontrent surtout en Chine et en Asie du Sud-Est [Gentilini M *et al.*, 1993]. Une étude réalisée chez les Mélanésien, a montré une corrélation entre les fréquences élevées d' α -thalassémie et l'endémicité palustre dans cette région [Flint J *et al.*, 1986]. L'association entre l' α -thalassémie et la protection contre l'infection palustre a été retrouvée dans plusieurs études et le mécanisme de protection révélé par Williams *et al.* décrit la sélection de l' α -

thalassémie pour sa capacité à accroître la susceptibilité à l'infection par *P. vivax* qui agit ainsi comme un vaccin naturel contre l'infection par *P. falciparum* [Williams TN *et al.*, 1996, Nature ; Allen SJ *et al.*, 1997].

1-2-2-6. Les antigènes Duffy

Les protéines Duffy appartiennent à la famille des récepteurs de chémokines et sont localisées dans la membrane des hématies. Le système de groupe sanguin Duffy découvert par Cutbush *et al.*, est caractérisé par 3 variants principaux, FY*A aux fréquences élevées en Asie et dans le Pacifique, FY*B et FY*O présents dans les populations africaines sub-sahariennes [Cutbush M *et al.*, 1950; Hamblin MT *et al.*, 2000].

Les antigènes Duffy se sont révélés être les récepteurs utilisés par l'espèce plasmodiale *P. vivax* pour envahir les hématies [Horuk R *et al.*, 1993; Miller LH *et al.*, 1976; Barnwell JW *et al.*, 1989]. C'est ainsi que les sujets homozygotes pour FY*O (absence des antigènes Duffy) sont complètement résistants aux infections palustres par *P. vivax*, expliquant la sélection négative de ces infections palustres en Afrique sub-saharienne [Miller LH *et al.*, 1976; Hamblin MT *et al.*, 2000].

1-2-2-7. Les antigènes HLA

Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité qui codent pour les antigènes HLA, sont les plus polymorphes chez l'homme avec 96 et 106 allèles respectivement pour les classes I et II [Hill AV *et al.*, 1991].

Les antigènes HLA ont été plusieurs fois évoqués dans la résistance/susceptibilité aux infections palustres simples ou graves. C'est une étude cas-témoin réalisée sur 2000 sujets en Gambie qui a montré clairement une association entre un allèle dans chaque classe, HLA-B53 (classe I) et HLA-DRB1*1302 (classe II), et la protection contre les formes sévères du

paludisme [Hill AV *et al.*, 1991]. Une autre étude longitudinale effectuée sur plus de 4 ans au Gabon, a révélé une association entre le HLA-DRB1*0501 (classe II) et la protection contre l'anémie palustre et la ré-infection par les plasmodies chez les enfants [May J *et al.*, 2001]. L'association de l'allèle HLA-B53 (classe I) avec un effet protecteur, serait liée à la présentation par l'antigène B53 d'un peptide (LSA1) du stade hépatique, aux lymphocytes T cytotoxiques restreints aux HLA-B53 [Hill AV *et al.*, 1992]. Il est à noter que les 2 allèles HLA (B-53 et DRB1*1302) n'ont pas été associés à la sévérité de l'infection palustre dans une étude similaire réalisée par Hill *et al.* au Kenya. Les influences du terrain génétique de l'homme et des polymorphismes du parasite pourrait expliquer l'hétérogénéité géographique de ces associations [Hill AV, 1996].

1-2-2-8. Les récepteurs endothéliaux ICAM-1 et CD36

Une explication à la sévérité du paludisme propose comme élément central la cyto-adhérence des hématies parasitées aux vaisseaux endothéliaux par l'intermédiaire des récepteurs tels que le CD36 ou l'ICAM-1.

Des études histochimiques ont montré que les récepteurs ICAM-1 étaient impliqués dans l'adhésion des érythrocytes parasités aux capillaires du cerveau chez les sujets atteints de paludisme cérébral [Turner GD *et al.*, 1994]. Une mutation dans le gène du récepteur ICAM-1, conduit à un remplacement d'acide aminé (la lysine en position 29 par la méthionine). Ce variant génétique ICAM-1^{kilifi} rencontrée généralement dans les populations noires, a permis de montrer l'hétérogénéité génétique concernant la susceptibilité/résistance au paludisme sévère. Ce variant ICAM-1^{kilifi} a été associé à une susceptibilité aux accès sévères de paludisme au Kenya, et à la résistance au paludisme grave au Gabon, mais également une absence d'association a été observée en Gambie [Fernandez Reyes D *et al.*, 1997; Bellamy R *et al.*, 1998; Kun JF *et al.*, 1999].

Une action en synergie des récepteurs ICAM-1 et CD36 a été établie concernant l'adhésion des hématies parasitées par *P. falciparum* aux cellules endothéliales humaines mises en culture [McCormick CJ *et al.*, 1997]. C'est ainsi que différentes mutations présentes chez les Noirs principalement sur le gène CD36 et produisant une protéine CD36 déficiente, ont été associées à la susceptibilité ou à la résistance contre les formes sévères du paludisme [Aitman TJ *et al.*, 2000; Pain A *et al.*, 2001; Omi K *et al.*, 2003].

1-2-3. Antigènes ABO

Présents dans toutes les populations, ces antigènes sont régulièrement analysés dans les différentes études épidémiologiques. Le groupe sanguin O est retrouvé en Afrique avec une prévalence élevée.

Aucune association n'a été retrouvée entre les antigènes ABO et l'infection palustre simple dans plusieurs études [Montoya F *et al.*, 1994; Bayoumi RA *et al.*, 1986]. Par contre, les antigènes A ont été associés à la susceptibilité au paludisme grave [Fischer PR *et al.*, 1998; Lell B *et al.*, 1999], et le groupe sanguin O a été lié à la protection contre les accès sévères de paludisme [Hill AV, 1992; Weatherall DJ, 1996].

L'un des éléments clés de la résistance/susceptibilité associée aux antigènes ABO contre les formes sévères du paludisme, est le phénomène de formation en rosettes [Rowe A *et al.*, 1995]. Caractéristique de paludisme grave, la formation en rosettes s'effectuerait plus rapidement chez les sujets de groupe sanguin A ou B plutôt que chez ceux de groupe O [Udomsangpetch R *et al.*, 1993]. Il a été montré que les antigènes A sont des co-récepteurs pour la formation en rosettes des hématies parasitées par *P. falciparum* [Barragan A *et al.*, 2000].

Concernant les autres formes d'infection palustre, on peut constater que le rôle ou l'influence des antigènes ABO lors d'infections palustres asymptomatiques et lors d'accès simples de paludisme, ont été peu étudiés.

1-2-4. Déficience en glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)

Première enzyme de la glycolyse anaérobie, la glucose-6-phosphate dehydrogenase est impliquée dans l'élimination des peroxydes toxiques pour les hématies. La déficience en G6PD atteint environ 400 millions de sujets largement répartis dans la race noire mais aussi sur le pourtour méditerranéen, le Moyen Orient et l'Asie du Sud-Est. Fréquente chez les Noirs Africains avec une prévalence de 10 à 30%, la G6PD déficiente est ici la variante A-. Cette déficience, asymptomatique dans les conditions physiologiques, se traduit uniquement par des accès hémolytiques déclenchés par la prise de médicaments oxydants tels que les amino-8-quinoleines utilisés contre le paludisme [Gentilini M *et al.*, 1993].

Le gène de la G6PD d'une taille d'environ 18Kb, localisé sur le bras long du chromosome X (Xq28), est très polymorphe avec plus de 300 allèles connus qui génèrent plus de 100 variants phénotypiques [Chen EY *et al.*, 1992; Xu W *et al.*, 1995]. Les mutations identifiées sur le gène de la G6PD sont réparties en 2 catégories : les mutations polymorphes responsables de déficiences enzymatiques peu sévères et les mutations sporadiques entraînant des déficiences sévères avec parfois des hémolyses chroniques. Trois types de variants sont communément observés en Afrique Noire (G6PD A, B et A-) et seul le G6PD A- est un variant déficient codant pour une enzyme d'activité réduite (12% d'activité). La caractérisation moléculaire de ces variants montre qu'ils diffèrent les uns des autres en fonction de 2 mutations, 376A→G et 202G→A. Soient donc les variants suivants: G6PD A (G₃₇₆G₂₀₂), G6PD B (A₃₇₆) et G6PD A- (G₃₇₆A₂₀₂) [Hirono A *et al.*, 1988].

Une corrélation géographique, entre la distribution de la déficience en G6PD et la prévalence de l'infection palustre, a permis de suggérer que les variants déficients puissent conférer une certaine protection ou résistance à l'infection par les plasmodies [Ganczakowski M *et al.*, 1995; Tishkoff SA *et al.*, 2001].

Différents travaux *in vitro* ont à leur tour suggéré les mécanismes possibles de cette éventuelle protection contre les espèces plasmodiales. Il a été montré que la croissance *in vitro* des plasmodies dans les hématies déficientes en G6PD, était en partie inhibée dans les conditions de stress oxydatif [Friedman MJ *et al.*, 1979; Roth EF *et al.*, 1983]. D'autre part la phagocytose des érythrocytes parasités a été observée de manière plus accrue (2,3 fois) concernant les hématies déficientes en G6PD que pour celles à activité G6PD normale, dans un contexte précis c'est-à-dire au stade des formes jeunes de parasite [Cappadoro M *et al.*, 1998].

Etablies pour confirmer l'effet protecteur des variants déficients en G6PD contre l'infection palustre (surtout sévère), les différentes études d'association cas-témoins ont révélé un ensemble de résultats contradictoires. Ces résultats vont de l'absence à la présence d'association entre les différents variants alléliques et l'infection palustre, en passant par l'existence d'association uniquement chez les sujets hétérozygotes G6PD [Lell B *et al.*, 1999; Kar S *et al.*, 1992; Martin SK *et al.*, 1979; Bienzle U *et al.*, 1979]. De toutes les études effectuées, seule celle de Ruwende C *et al.*, a permis de chiffrer la protection conférée par les variants alléliques déficients en G6PD : hétérozygotes (46%) et hémizygotés (58%) [Ruwende C *et al.*, 1995].

Plusieurs écueils augmentent la complexité de la relation entre les variants alléliques G6PD et l'infection par les plasmodies. Chez les sujets hétérozygotes G6PD par exemple, suite à l'inactivation partielle de l'un des chromosomes X et par conséquent de l'un des 2 allèles, l'expression du gène est modifiée, influençant la déficience en G6PD [Roth EF *et al.*,

1983]. Il est aussi observé que la croissance altérée des parasites dans les hématies déficientes en G6PD, est restaurée après plusieurs cycles, à la suite de changements adaptatifs opérés par le plasmodium comme l'induction de la synthèse d'une nouvelle enzyme G6PD [Usanga EA *et al.*, 1985].

Les études d'épidémiologie génétique de la déficience en G6PD demeurent importantes compte tenu du risque d'accidents hémolytiques à la suite de l'utilisation des molécules antipaludiques oxydants en zones d'endémie palustre élevée.

1-2-5. Facteur alpha de nécrose des tumeurs (TNF- α)

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les monocytes/macrophages activés, mais aussi par les lymphocytes T, B, NK et un certain nombre d'autres cellules [Aggarwal BB *et al.*, 1996]. Son expression est induite par les lipopolysaccharides bactériens, les mitogènes et les virus, et elle est régulée à la fois de manière transcriptionnelle et post-transcriptionnelle [Golfeld AE *et al.*, 1990; Han J *et al.*, 1990].

Le gène codant pour le TNF est localisé dans la région HLA de classe II, et il a une longueur d'environ 750kb. Dix polymorphismes ont été recensés dans la région promotrice, un polymorphisme de type insertion dans le premier exon et deux autres polymorphismes dans le premier intron de ce gène [Wilson AG *et al.*, 1992; D'Alfonso S *et al.*, 1994; Zimmerman PA *et al.*, 1996]. Tous ces polymorphismes ont été associés avec la production de TNF, la susceptibilité et la sévérité de différentes pathologies, sans apporter des conclusions définitives [De Jong BA *et al.*, 2002].

Concernant l'infection palustre, la production de TNF- α survient à la suite de la libération d'antigènes plasmodiaux suivant des mécanismes impliquant les macrophages, les cellules T, les cellules NK et l'interféron- γ . L'implication du TNF- α dans l'infection palustre,

a été étudiée à l'aide d'un modèle murin de neuro-paludisme par *P. berghei*, où l'administration d'anticorps monoclonaux anti-TNF- α prolonge la survie des souris infectées en prévenant la cyto-adhérence et les lésions cérébrales au niveau des micro-vaisseaux [Grau GE *et al.*, 1987].

Des études *in vitro* chez l'homme, ont montré la sécrétion de TNF- α par les macrophages en réponse aux toxines des espèces plasmodiales [Kwiatkowski D *et al.*, 1989]. Cette sécrétion est plus importante avec des isolats issus de sujets présentant un neuro-paludisme qu'avec des isolats de sujets non malades [Allan RJ *et al.*, 1995]. Des études *in vivo* en zones endémiques de *P. falciparum*, ont permis d'observer des taux sériques élevés de TNF- α chez des enfants présentant un paludisme cérébral à l'issue fatale [Kwiatkowski D *et al.*, 1990; Grau GE *et al.*, 1989].

Chez l'homme, il existe plusieurs modes possibles de stimulation et autant de rôles du TNF- α dans la physiopathologie de l'infection palustre (Figure 2) [Hommel M, 1996]. Ainsi, il a été observé une action anti-parasitaire du TNF- α sur les stades érythrocytaires par l'inhibition de la croissance des parasites [Playfair JH *et al.*, 1987]. D'un autre côté, le TNF- α induit l'expression à la surface de cellules endothéliales, des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) et E-selectin, impliquées dans les mécanismes de cyto-adhérence associés au neuro-paludisme [Berendt AR *et al.*, 1989; Ockenhouse CF *et al.*, 1992]. Le TNF- α est considéré comme le principal inducteur de la fièvre et cela a été mis en évidence lorsqu'à la suite d'une administration d'anticorps anti-TNF- α à des enfants atteints de neuro-paludisme, il a été observé une diminution dose-dépendante de la fièvre [Kwiatkowski D *et al.*, 1993]. Le TNF- α intervient également dans l'infection palustre en favorisant les mécanismes de phagocytose opérée par les macrophages et par les polynucléaires neutrophiles [Kumaratilake LM *et al.*, 1991]. Le TNF- α est aussi impliqué dans les phénomènes de "cytotoxicité des macrophages" dépendante des anticorps ADCI

(antibody dependant cellular inhibition) [Bouharoun-Tayoun H *et al.*, 1995]. Et enfin le TNF- α participe à la libération de radicaux oxygénés et d'oxyde nitrique [Rockets KA *et al.*, 1992].

De tous les polymorphismes présents sur le gène du TNF- α , trois seulement situés dans la région promotrice ont été associés de manière significative à l'infection palustre grave: -308, -238 et -376.

Dans une étude en Gambie, la mutation TNF- α -308G \rightarrow A chez les sujets homozygotes, associe un risque de décès ou de séquelles neurologiques sept fois plus important et un risque d'accès de neuro-paludisme 4 fois plus important que chez les sujets "non mutés" [McGuire W *et al.*, 1994]. Dans une région méso-endémique comme le Sri Lanka, il a été observé chez les sujets hétérozygotes pour la mutation TNF- α -308, un risque d'accès palustres sévères 2 à 3 fois plus important que chez les sujets "non mutés" [Wattavidanage J *et al.*, 1999].

Le deuxième polymorphisme TNF- α -238G \rightarrow A, a été associé en Gambie à une susceptibilité accrue (2 à 3 fois) pour l'anémie palustre sévère, impliquant 2 variants TNF- α différents qui correspondraient chacun à une forme grave du paludisme [McGuire W *et al.*, 1999].

En Afrique de l'Ouest (Gambie) et de l'Est (Kenya), le troisième polymorphisme TNF- α -276G \rightarrow A, présent à la fréquence de 5% chez les Africains, a été associé à un risque 4 fois plus important de paludisme cérébral chez les hétérozygotes que chez les sujets "non mutés" [Knight JC *et al.*, 1999].

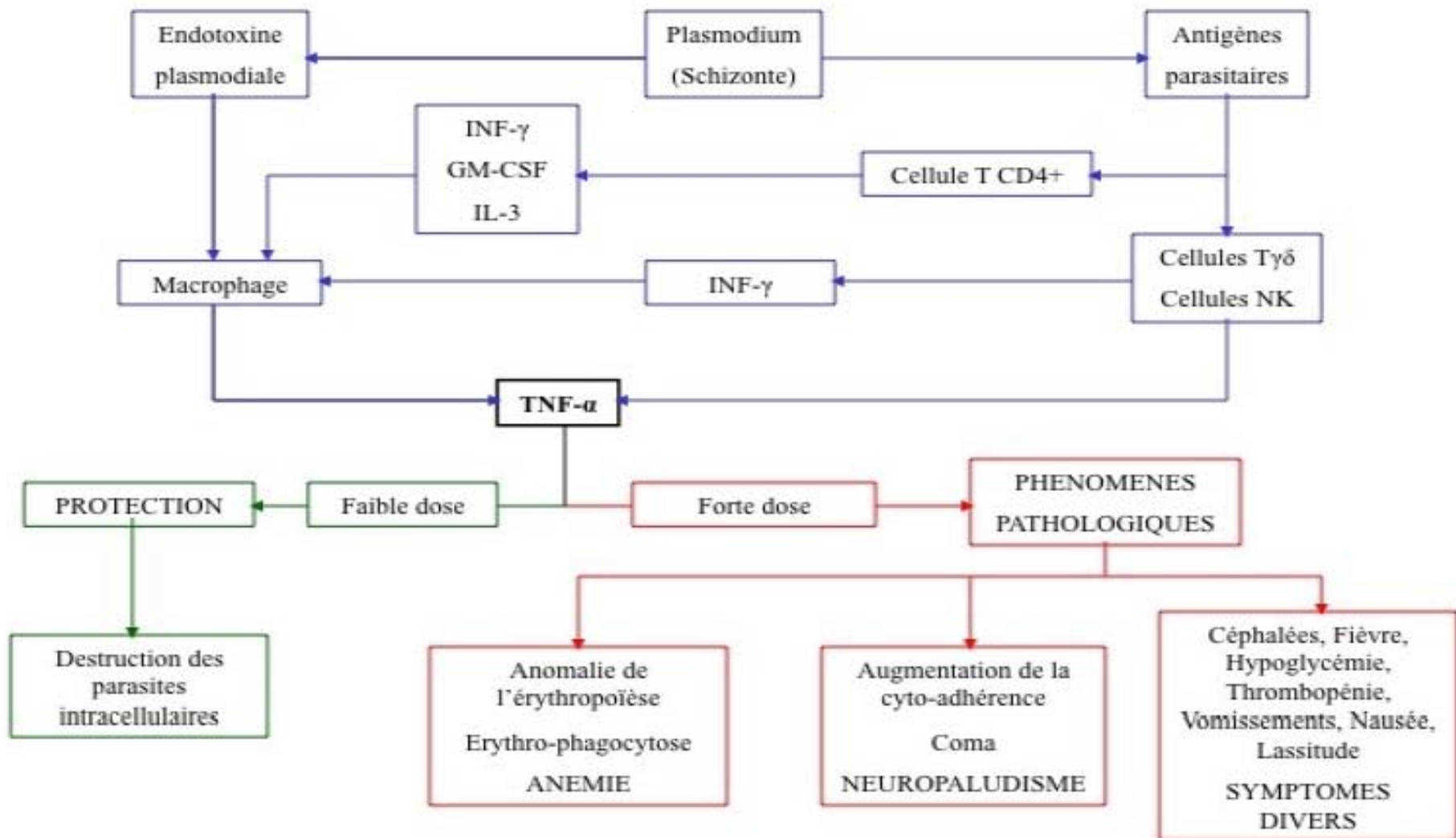


Figure 2: Modes possibles de stimulation et rôles du TNF- α dans la physiopathologie de l'infection palustre [Adaptée de Hommel M *et al.*, 1996]

1-2-6. Synthase de l'oxyde nitrique inductible (iNOS ou NOS2)

L'oxyde nitrique (NO), radical libre de courte durée de vie, est une molécule médiatrice de différentes fonctions dont la vasodilatation, la neurotransmission et des activités anti-microbienne et anti-tumorale. Mais produite en quantité élevée, cette molécule a des répercussions négatives pour les cellules de l'hôte et par conséquent elle contribue aux mécanismes pathologiques [Burgner D *et al.*, 1999].

La synthase de l'oxyde nitrique (NOS) est l'enzyme permettant de produire du NO à partir de la L-arginine, par de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales, les neurones, les macrophages, les hépatocytes, les cellules des muscles lisses, les chondrocytes et les myocytes cardiaques [Chartrain NA *et al.*, 1994]. Cette enzyme existe sous 3 isoformes différenciées par leur origine cellulaire ou par le mécanisme contrôlant leur expression: la NOS neuronale, la NOS endothéliale et la NOS inductible. A la différence des deux autres NOS dont l'activité est régulée de manière post-transcriptionnelle, la NOS inductible est induite au niveau transcriptionnel par des anticorps bactériens et des cytokines inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) via la région promotrice en 5' du gène, mais aussi au niveau post-transcriptionnel en présence de l'interféron- γ [Nathan C *et al.*, 1994; Spitsin SV *et al.*, 1996].

L'implication du NO dans la susceptibilité/résistance contre l'infection palustre a été démontrée en utilisant le modèle murin. Une corrélation entre l'expression du NO et la résistance aux stades sanguins de *P. chabaudi* a été observée chez la souris [Jacobs P *et al.*, 1995]. D'autres expériences *in vivo*, utilisant les inhibiteurs de la NOS inductible et la technique du "Knock-out" du gène de la NOS2, ont également montré le contrôle de l'infection à *P. berghei* par le NO chez la souris [Seguin MC *et al.*, 1994].

Chez l'homme, le NO a été évoqué comme élément important de la réponse de l'hôte, médiant les effets anti-parasitaires des cytokines pro-inflammatoires à chaque stade du cycle biologique du parasite [Clark IA *et al.*, 1996; Kremsner PG *et al.*, 1996]. En dehors de ce rôle

protecteur, le NO a été impliqué comme médiateur dans le paludisme cérébral définissant une controverse concernant son rôle dans cette forme sévère du paludisme. D'une part, des taux plasmatiques élevés de NO ont été corrélés avec l'intensité croissante du coma dans le neuro-paludisme en Papouasie-Nouvelle-Guinée [Al-Yaman FM *et al.*, 1996]. D'autre part ce sont des taux faibles de NO (mais aussi de NOS2 et de L-arginine) qui ont été retrouvés chez des sujets présentant un paludisme cérébral [Anstey NM *et al.*, 1996; Lopansri BK *et al.*, 2003]. Ces résultats conflictuels proviennent des difficultés d'interprétation ou d'analyses dues au fait que les concentrations de NO (nitrite et nitrate) dans le sang ou dans l'urine, sont profondément affectées par la diète, le fonctionnement du rein et l'hydratation (faits marquants d'un accès sévère) [Burgner D *et al.*, 1999]. Une autre raison des difficultés d'interprétation, réside dans le fait que les taux plasmatiques de NO ne refléteraient pas la production locale de NO dans les organes clés (la rate, la moelle osseuse et le cerveau). Le NO des fluides cérébro-spinaux, qui serait plus représentatif de la production locale cérébrale de NO, est moins affecté par l'environnement, et il augmente lors d'accès cérébraux de paludisme, suggérant un effet protecteur contre cette forme grave de paludisme [Weiss G *et al.*, 1998].

Le gène de la NOS inductible, localisé en 17q11.2, a une taille de 37 kb et il comprend 26 exons et 25 introns [Chartrain NA *et al.*, 1994]. Les analyses immuno-histochimiques de l'expression de la NOS inductible ou les études des variants génétiques pour la production de NO, se révèlent très intéressantes à l'occasion d'associations pathologiques. Dans une étude réalisée au Gabon, les sujets hétérozygotes pour la mutation NOS2 -954G→C dans le promoteur du gène NOS2, présentent un risque faible de ré-infections palustres, et ils expriment également une enzyme NOS inductible d'activité basale sept fois plus importante que celle retrouvée chez les sujets homozygotes "non mutés" [Kun JF *et al.*, 1998; Kun JF *et al.*, 2001]. En outre, une autre étude chez les enfants gambiens a montré une association entre

le paludisme cérébral fatal et les microsatellites CCTTT en nombre faible dans une région de 2,5kb en région 5' du site de transcription de NOS2 [Burgner D *et al.*, 1998]. Une autre étude effectuée en Tanzanie, n'a montré aucune association entre ces deux précédents polymorphismes de la région promotrice du gène NOS2 et l'infection palustre, suggérant une hétérogénéité géographique fonctionnelle de ces variants génétiques [Levesque MC *et al.*, 1999]. Récemment, une étude réalisée en Tanzanie et au Kenya, a révélé un troisième polymorphisme (situé entre les 2 précédents), NOS2 -1173C→T, associé à une protection contre les 2 formes graves de paludisme [Hobbs MR *et al.*, 2002]. Ce nouveau polymorphisme est également associé à des concentrations élevées de métabolites NO dans le plasma et dans les urines [Hobbs MR *et al.*, 2002].

1-2-7. Glycoprotéines membranaires CD1

Les glycoprotéines membranaires CD1 (1st Cluster of Differentiation) sont une nouvelle famille singulière de molécules présentatrices d'antigènes à des lymphocytes T, en dehors des produits classiques du CMH. Cette singularité vient de leur aptitude à présenter des lipides et des glycolipides. Les glycoprotéines CD1 ont une structure proche de celle des molécules du CMH de classe I, car elles sont également constituées d'une chaîne lourde transmembranaire associée à une chaîne de β 2-microglobuline. En revanche, en terme de distribution cellulaire, les molécules CD1 sont proches de celles du CMH de classe II [Porcelli SA *et al.*, 1999].

La famille de gènes CD1 humains, composée de 5 types de gènes (CD1A, B, C, D et E) peut être divisée selon leur séquence génique en 2 groupes: groupe I (CD1A, CD1B, CD1C) et groupe II (CD1D). Le CD1E présente des caractéristiques intermédiaires des 2 groupes, il est recensé dans le groupe II mais pourrait constituer un troisième groupe [Porcelli SA *et al.*, 1999; Park SH *et al.*, 2000].

Chez l'homme, les glycoprotéines CD1 du groupe I sont préférentiellement exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes alors que la glycoprotéine du groupe II semble avoir une distribution tissulaire beaucoup plus large (cellules présentatrices d'antigènes, cellules stromales, cellules épithéliales, etc...), et que la molécule CD1E semble-t-il, est exprimée seulement de façon intracellulaire dans les cellules dendritiques [Porcelli SA *et al.*, 1999; Angénieux C *et al.*, 2000]. Les glycoprotéines du groupe I uniquement, sont capables de présenter des allo-antigènes lipidiques et glycolipidiques présents dans la paroi de différentes bactéries à des lymphocytes T spécifiques. Concernant les auto-antigènes, ils peuvent être présentés par les molécules CD1 des 2 groupes I et II [Porcelli SA *et al.*, 1999; Jullien D *et al.*, 1999].

La sécrétion du TNF- α par les macrophages, (phénomène impliqué dans les formes graves du paludisme) est induite par des molécules parasitaires telles que le GPI (glycosyl-phosphatidylinositol), lui-même synthétisé par les stades asexués érythrocytaires des plasmodies [Bate CA *et al.*, 1988; Schofield L *et al.*, 1993]. En outre les toxines GPI des espèces plasmodiales induisent l'expression de NOS dans les macrophages et les cellules endothéliales vasculaires. Ces toxines activent également l'expression des récepteurs ICAM-1, VCAM-1 et E-selectine des cellules vasculaires endothéliales, augmentant la cytoadhérence des plasmodies [Tachado SD *et al.*, 1996; Schofield L *et al.*, 1996].

La capacité spécifique des glycoprotéines CD1 à présenter aux lymphocytes T des antigènes lipidiques et glycolipidiques et en particulier ceux du groupe des glycosyl-phosphatidyl inositols (principales molécules des toxines plasmodiales), a retenu notre attention quant à l'implication éventuelle des glycoprotéines CD1 dans la réponse immune dirigée contre les antigènes de plasmodies. En effet, il a été observé au Kenya que les adultes résistants au paludisme, possédaient un titre élevé d'anticorps anti-GPI dirigés contre la partie phosphoinositol du GPI [Naik RS *et al.*, 2000].

Les gènes CD1 localisés sur le chromosome 1 (1q22-23), sont considérés comme peu polymorphes. Les études réalisées sur le polymorphisme de ces gènes ont montré :

- les gènes CD1B et CD1C présentant chacun une mutation silencieuse et rare (CD1B-174T→C et CD1C-99C→T),
- le gène CD1D avec une mutation rare, CD1D-136A→T (T46S)
- le gène CD1A révélant 2 mutations liées, 38T→C (I13T) et 153G→C (W51C), et générant 2 allèles prévalents,
- et le gène CD1E comme étant le plus polymorphe avec 3 mutations, 236A→G (Q79R), 460C→T (R154W) et 551T→C (L184P) [Han M *et al.*, 1999; Mirones I *et al.*, 2000].

Une étude cas-témoins effectuée entre les variants génétiques de CD1 et une pathologie infectieuse, a conclu à une absence d'association entre ces variants et l'infection pulmonaire à *Mycobacterium malmoeense* [Jones DC *et al.*, 2001]. Les analyses génétiques et fonctionnelles des polymorphismes de même que les études cas-témoins sont requises concernant les molécules CD1.

2. CADRE ET OBJECTIFS

2-1. CADRE DE L'ÉTUDE

Ce travail a été réalisé en zone tropicale précisément au Gabon (Afrique Centrale). Pays où le paludisme est endémique, le Gabon couvre une superficie de 267.667 km² et est situé de part et d'autre de l'équateur. La Guinée équatoriale, le Cameroun, le Congo et l'Océan atlantique délimitent cet Etat composé de 9 provinces (Estuaire, Haut-Ogooué, Moyen-Ogooué, Ngounié, Nyanga, Ogooué-Ivindo, Ogooué-Lolo, Ogooué-Maritime et Woleu-Ntem). Une trentaine d'ethnies d'origine Bantou composent cette nation qui a vu, à la suite de l'exode rurale, se développer des zones péri-urbaines autour des 4 grandes villes que sont Libreville, Port-Gentil, Oyem et Franceville.

Bien drainée en eau, le Gabon possède un bassin côtier, des lacs et lagunes et surtout un réseau fluvial dense dont l'Ogooué, fleuve de 1200 km, traversant le pays d'est en ouest, constitue "l'épine dorsale". Le climat de type équatorial est caractérisé par quatre saisons, la petite saison sèche (mi-décembre à mi-février), la grande saison de pluies (mi-février à mi-juin), la grande saison sèche (mi-juin à mi-septembre) et la petite saison de pluies (mi-septembre à mi-décembre). La végétation gabonaise est essentiellement forestière (80%), avec des forêts d'une trame importante et hostiles à l'homme. Les zones de savanes représentent environ 20% du territoire et elles se retrouvent dans les parties méridionale et orientale. Le climat chaud et humide présente une humidité relative moyenne oscillant de 80 à 100%. La température moyenne annuelle est de 25°C.

Tous ces éléments descriptifs de la région gabonaise, ont une influence directe ou indirecte sur le profil de l'infection palustre notamment sur l'endémicité palustre variant du type méso-endémique à holo-endémique.

La structure scientifique qui a servi de siège à ce travail au Gabon est le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF). Organisme également financier de ce travail, le CIRMF fondé en 1979, développe ses activités autour de trois axes interactifs que sont la recherche, la formation et la santé publique. La recherche au CIRMF repose sur 3 principales thématiques : le paludisme, la filariose, et les viroses constituées par le VIH et le virus Ebola. Cette institution de recherches dispose de structures particulières comme :

- le centre de primatologie (CDP)

Plus de 300 primates simiens y vivent en captivité ou en semi-liberté. Une dizaine d'espèces simiennes sont représentées et permettent d'étudier d'une part les transmissions croisées de microorganismes entre les primates simiens et humains, et d'autre part la mise en place de l'immunité en érigeant un modèle primate expérimental de chaque pathologie.

- la station de la Lopé

C'est une structure d'étude de terrain, nichée dans l'une des réserves naturelles du Gabon. Les primates en liberté mais aussi les espèces forestières (plantes d'okoumé etc...) y sont étudiés.

- le laboratoire d'analyses médicales (LAM)

Estampillé laboratoire de référence OMS pour le diagnostic des viroses, il est une structure de santé publique et de recherche.

- la base-dispensaire de Dienga

Cette entité érigée par le CIRMF en 1994, est une annexe du laboratoire de parasitologie. Plusieurs programmes y ont été réalisés : entomologie, génétique humaine, génétique des parasites, épidémiologie et immunologie.

En aval de ce travail, l'Unité INSERM 458 de l'Hôpital Robert Debré à Paris, a étroitement collaboré avec le CIRMF pour l'interprétation des données expérimentales.

2-2. ETUDES ANTERIEURES

Ce travail intègre le programme d'études longitudinales et transversales réalisées sur le site de Dienga, au Sud-Est du Gabon. Il a été réalisé à la suite d'autres travaux tels que les études épidémiologiques qui montrent que la presque totalité des enfants entre en contact avec les plasmodies. En effet, 90,8% des enfants ont par examen microscopique, révélé l'existence de parasites dans leur sang et 98,7% possèdent des anticorps reconnaissant les antigènes d'un extrait de schizonte [Deloron P *et al.*, 1999].

L'étude de la réponse immune contre les plasmodies, a montré des parasitémies faibles ou nulles associées à des taux élevés d'anticorps IgG1 et IgG3 [Luty AJ *et al.*, 1994], et des réponses lympho-prolifératives aux peptides parasitaires MSA-1 et MSA-2, corrélées avec une protection palustre clinique [Migot-Nabias F *et al.*, 1999].

Le degré élevé du polymorphisme génétique des souches plasmodiales a été mis en évidence chez les enfants de Dienga infectés par les plasmodies, en particulier chez ceux présentant une infection asymptomatique [Ntoumi F *et al.*, 1996]. Sur le plan de la génétique de l'hôte humain, les familles alléliques du complexe HLA ont été associées à des réponses cellulaires à plusieurs peptides de l'antigène LSA-1 de *P. falciparum* [Migot-Nabias F *et al.*, 2001]. Le trait drépanocytaire, présent autour de 20-25% dans la population gabonaise, a été associé à une faible prévalence d'infections palustres, et lors d'infections palustres asymptomatiques, un taux élevé d'infections multiples a été retrouvée chez les enfants porteurs d'hémoglobine AS [Ntoumi F *et al.*, 1997].

2-3. OBJECTIF GENERAL

L'objectif général de ce travail réside dans l'étude des caractéristiques génétiques de l'hôte humain, élément important du triangle Homme-*Plasmodium*-Anophèle régissant la physiopathologie de l'infection palustre. Par cette étude, nous avons à combler les méconnaissances en génétique de l'hôte africain issu de l'Afrique Centrale (région d'endémicité palustre élevée comparativement à l'Afrique de l'Ouest). Il s'agissait donc dans cette région, d'évaluer l'impact des facteurs génétiques de l'hôte gabonais, en établissant leur association avec la susceptibilité ou la résistance à l'infection par *P. falciparum*.

2-4. OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

La première étape de cette étude, a été de déterminer dans une zone endémique palustre, précisément dans la population gabonaise, la fréquence des différents variants génétiques impliqués dans l'infection palustre.

La seconde étape a été d'évaluer par des études cas-témoins, les éventuelles associations entre les variants alléliques des gènes candidats et les formes non-graves de l'infection palustre.

En dehors du système HLA et du variant génétique de la drépanocytose étudiés en partie en relation avec l'infection palustre, nous avons à analyser 2 groupes de facteurs génétiques :

1) Les facteurs génétiques liés au globule rouge :

- Le trait drépanocytaire
- les antigènes ABO
- la déficience en glucose-6-phosphate dehydrogenase

2) Les facteurs génétiques liés à la réponse immune :

- le facteur α de nécrose des tumeurs (TNF- α)
- la synthèse de l'oxyde nitrique inductible (NOS2)

- la protéine liant le mannose (MBL)
- les glycoprotéines CD1.

Chaque variant génétique a été étudié en relation avec chacune des deux formes d'infection palustre prédominantes sur le site de Dienga :

- l'infection simple
- l'infection asymptomatique.

Cette première partie de notre travail de thèse a apporté des données d'épidémiologie génétique sur ces populations d'Afrique Centrale, soumises à l'importante pression du paludisme. Mais surtout il a permis, à travers la relation variant génétique et infection palustre décrite, de proposer un éclairage sur l'un des aspects de l'influence des allèles G6PD A- et TNF- α -238A sur l'infection palustre. La relation facteurs génétiques et infection palustre asymptomatique, a été abordée pour la première fois, dans une publication issue de notre travail de thèse.

3. MÉTHODOLOGIE

3-1. MATERIEL

3-1-1. Site de Dienga

Le site de Dienga, où a été réalisée cette étude, est un regroupement de petits villages, il est devenu une sous-préfecture depuis 1997. Dienga compte près de 1200 habitants majoritairement du groupe ethnique Nzébi et abrite une école primaire, un dispensaire d'Etat et une base-dispensaire du CIRMF. Situé au sud-est du Gabon, dans la province de l'Ogooué-Lolo, Dienga se trouve à une altitude de 350m dans une région vallonnée, composée de savane et de forêt.

Dans la région de Dienga, la température annuelle, fluctue entre 23 et 27°C, et la pluviométrie peut atteindre 400mm [Elissa N *et al.*, 1999]. La transmission palustre y est pérenne avec de fortes variations liées à la saison. Les accès graves de l'infection palustre ne sont pas fréquents. La prise en charge gratuite par les structures de santé participe sûrement à cet état de fait.

A Dienga, 4 espèces d'anophèles sont vectrices de l'infection palustre, *An. gambiae* (96%), *An. moucheti*, *An. hancocki* et *An. funestus*, et une moyenne de 8,5 piqûres d'anophèles par personne et par nuit (de 18h à 6h) y est recensé [Elissa N *et al.*, 2003]. Le taux moyen d'inoculation EIR (entomological inoculation rate) y est de 0,28 piqûre infestante par personne et par nuit, c'est-à-dire 100 piqûres infestantes par personne et par an [Elissa N *et al.*, 2003]. Au sud-est du Gabon, le nombre de piqûres par des anophèles est 10 fois plus élevé en zone rurale plutôt qu'en zone urbaine [Elissa N *et al.*, 1999].

3-1-2. Sujets

Les études réalisées à Dienga ont été avaluées auparavant par le Comité d’Ethique du CIRMF. Ensuite un consentement éclairé a été obtenu de la part des parents et tuteurs des enfants concernés. Il faut noter que les autorités administratives et politiques dudit lieu ont préalablement été informées de ces investigations.

Deux cohortes d’enfants issus de l’école primaire de Dienga, ont été réalisées en tenant compte de la forme de l’infection palustre étudiée.

3-1-2-1. Cohorte 1 « Infection palustre simple »

Les enfants, concernés par l’étude de l’infection palustre simple, ont été recrutés au nombre de 300 dont 169 garçons et 131 filles, d’âge moyen de 10,4 ans. De février 1995 à mars 1996 (hormis les vacances scolaires) des opérations de contrôle et prélèvement ont été mises en place tous les 15 jours, soit 16 opérations.

Les accès palustres ont été déterminés suite à l’évaluation de la densité parasitaire (nombre de parasites par μL de sang) et à l’établissement de la présence de la fièvre. La présence de plasmodies et la densité parasitaire ont été déterminées par l’examen de la goutte épaisse. Par le frottis sanguin, l’espèce plasmodiale infectante a été identifiée. Les gouttes épaisses et les frottis sanguins ont été réalisés sur lame par prélèvement d’une goutte de sang capillaire au niveau du bout de doigt. Ils ont été colorés avec une solution de Giemsa diluée à 10% dans de l’eau tamponnée hypotonique pour Giemsa et examinés au microscope à immersion.

La charge ou densité parasitaire a été évaluée sur la base de 200 leucocytes pour une lame positive et de 400 leucocytes pour une lame négative, et en considérant que la leucocytémie moyenne est de 8000 leucocytes/ μL de sang chez nos sujets.

Soit le calcul de la densité parasitaire (DP) :

$DP \text{ (parasites}/\mu\text{L)} = \text{nombre de parasites} / \text{nombre de globules blancs comptés} \times 8000$

Chaque densité parasitaire observée, a ensuite été ajustée par calcul logarithmique par rapport à l'âge et à la date de prélèvement (DPA), puis une moyenne de DPA par enfant a été calculée (MDPA). La parasitémie, elle, reflète le pourcentage d'hématies infectées sur le nombre total d'hématies.

Les prélèvements de sang, réalisés par ponction veineuse dans 1 tube EDTA (éthylène diamine tetracetate) et dans 1 tube sec, ont été utilisés pour des examens hématologiques (numération et formule sanguine, groupe sanguin, drépanocytose) et des dosages sérologiques (anticorps). Les globules blancs, isolés suite à la lyse des hématies des échantillons de sang, ont permis d'extraire l'ADN ensuite utilisé pour caractériser les génotypes G6PD, TNF, NOS2 et MBL de chaque sujet.

Pour déterminer la relation entre les facteurs génétiques de l'hôte et l'infection palustre simple, 2 groupes de sujets ont été constitués en fonction de la présence ou l'absence d'un accès palustre :

- le groupe dit « protégé » (n = 76)

Il réunit les enfants qui durant les 11 mois de l'étude n'ont jamais été l'objet d'un épisode fébrile défini par une température axillaire franchement supérieure à 37,5°C, associé à une densité parasitaire à *P. falciparum* supérieure à 400 parasites par μL ou à la présence de métabolites 4-aminoquinoline dans leur urine [Mount DL *et al.*, 1989].

- le groupe dit « non-protégé » (n = 82)

Il compte en son sein des enfants ayant présenté un ou plusieurs accès simples de paludisme définis par la présence de fièvre associée à une densité parasitaire à *P. falciparum* supérieure à 5000 parasites par μL .

Il faut noter que les 2 seuils (400 et 5000 par/ μ L) ont été arbitrairement fixés en fonction de la littérature. En dehors de ces 2 groupes, il reste 142 enfants qui n'entrent pas dans les critères de l'étude et ils en ont donc été exclus.

Remarque : Calcul des moyennes des densités parasitaires ajustées (MDPA)

La densité parasitaire permet d'évaluer le niveau d'infection d'un sujet. Mais elle est connue pour être sous l'influence significative de différents paramètres que sont le lieu d'habitation, la saison du prélèvement et l'âge du sujet [Beadle C *et al.*, 1995; McElroy PD *et al.*, 1997]. Pour estomper l'effet de ces variables sur la variable d'intérêt qui est la densité parasitaire, nous avons appliqué une méthode de calcul qui est l'ajustement. Nos sujets étant dans le même périmètre d'habitation, l'ajustement a été effectué (i) sur la date de prélèvement, étant donné l'influence des variations saisonnières de transmission et (ii) sur l'âge, compte tenu que l'immunité anti-palustre s'installe progressivement avec l'âge. Les sujets ont été répartis en tranches croissantes d'âge et en groupes correspondant à chaque date de prélèvement. Le logarithme à base 10 des densités parasitaires a été calculé en ayant auparavant ajouté +1 à chaque densité parasitaire pour tenir compte des densités parasitaires nulles (lames négatives) : $\text{Log}_{10}(\text{DP}+1)$. La densité parasitaire ajustée a été déterminée par la formule :

$$\text{DPA} = \text{Log DP} - (\Sigma \text{Log DP} / \text{nombre de DP dans chaque groupe d'âge})$$

Ensuite la moyenne arithmétique des DPA a été calculée de la sorte :

$$\text{MDPA} = \Sigma \text{DPA} / \text{nombre de DPA par sujet}$$

Il faut noter que les densités parasitaires prises en compte excluent celles relevées durant les périodes symptomatiques (pendant l'accès palustre). La MDPA représente donc une valeur de la charge parasitaire d'un sujet donné quand il n'est pas malade. Pour qu'elle soit

représentative, elle n'a été calculée que lorsque le sujet présentait au moins 6 densités parasitaires relevées.

3-1-2-2. Cohorte 2 « Infection palustre asymptomatique »

Pour étudier l'infection palustre asymptomatique, 271 enfants dont 154 garçons et 117 filles, tous âgés de 7 à 19 ans, ont été recrutés dans cette même école de Dienga. Ces enfants ont été suivis pendant 4 mois, de février à mai 1995, période qui comprend la grande saison de pluies, associée à un niveau élevé de transmission. Au cours de ces 4 mois, les sujets ont été auscultés journalièrement pour une prise de température axillaire entre 8 et 10h. Puis ceux ayant présenté un état fébrile ($T^{\circ} > 37,5^{\circ}\text{C}$) associé à une densité parasitaire supérieure à 800 parasites/ μL ont été exclus de l'étude, soit 113 enfants.

Le seuil de 800 parasites/ μL de sang représente le seuil pyrogénique qui est la valeur au delà de laquelle l'accès fébrile présent chez un sujet serait dû aux espèces plasmodiales (à 95%). La détermination de ce seuil est fondée sur un modèle mathématique de régression logistique tenant compte d'éventuels facteurs de confusion (age, phénotype de l'hémoglobine). A l'exemple des études réalisées comme celle de Rogier *et al.* [Rogier C *et al.*, 1996], l'analyse par Ntoumi *et al.* des densités parasitaires observées chez des patients faisant un accès fébrile palustre, chez d'autres patients ayant une fièvre d'étiologie bactérienne, mycosique ou virale, et enfin chez des sujets ne présentant pas un état fébrile mais portant des espèces plasmodiales, a permis d'évaluer le seuil pyrogénique à 800 trophozoïtes/ μL de sang [données non publiées].

Tous les 15 jours, pendant 4 mois, un prélèvement de sang périphérique a été effectué chez les enfants non malades du paludisme. Pour différencier les sujets infectés mais ne présentant pas de symptômes de ceux non infectés, le génotypage de l'ADN parasitaire a été réalisé par amplification élective *in vitro* "nichée" (nested PCR) d'un bloc du gène MSA-2

(Merozoite surface antigen-2). Au regard des prélèvements et contrôles effectués pendant ces 4 mois, 60 enfants sur 158 n'ont pas montré dans leur sang la présence d'un génotype parasitaire, soient ainsi 60 sujets non infectés et 98 porteurs asymptomatiques. Par ailleurs, les prélèvements de sang effectués par voie veineuse, ont également été utilisés pour des examens hématologiques et pour des analyses moléculaires (variants génétiques de G6PD, MBL, TNF- α et NOS2). Ces analyses moléculaires ont été réalisées après extraction de l'ADN génomique par la méthode Phénol-Chloroforme.

Remarque : Génotypage de l'ADN parasitaire (amplification élective "nichée" ou nested-PCR du gène MSA-2)

Le choix du gène MSA-2 ou MSP-2 (Merozoite surface protein-2) pour le typage génétique de l'ADN parasitaire est tributaire du fait que celui-ci s'est révélé comme un des meilleurs marqueurs du polymorphisme allélique pour *P. falciparum* [Farnert A *et al.*, 2001]. Le bloc considéré du gène MSP-2 montre deux régions conservées aux extrémités et une région centrale variable. La première PCR utilise deux amorces qui s'hybrident chacune au niveau de chaque région conservée (voir Tableau 2). Ensuite, la deuxième PCR utilise des couples d'amorces spécifiques des familles alléliques décrites (3D7, FC27, ni 3D7 ni FC27). Les produits d'amplification ainsi obtenus sont visualisés à l'aide d'une électrophorèse en gel d'agarose à 1,5%. Pour évaluer le polymorphisme de taille et de séquence, on note qu'une bande sur gel d'agarose, représente un fragment d'ADN parasitaire amplifié et par conséquent un "génotype parasitaire" (comme le parasite est haploïde durant sa phase de reproduction asexuée, au stade sanguin).

ADN cible	T°	Amorces	Séquences des amorces
MSP-2 (PCR 1)	55°C	1	5'atgaaggtaattaaacattgtctattata3'
		4	5'atatggcaaaagataaaacaagtgtgcgt3'
MSP-2 (PCR 2)			
Non spécifique	55°C	2	5'aacgaattcataaacaatgcttataatatgagt3'
		3	5'gatgaattctagaacctatgcatatgtccatgtt3'
FC27	57°C	FC1	5'gcaaatgaaggttctaataactaatag3'
		FC2	5'gcttgggtccttcttcagttgattc3'
3D7	57°C	D1	5'gcagaaagtaagccttctactgggtgct3'
	57°C	D2	5'gatttgttcggcattattatga3'

Tableau 2: Séquences des oligonucléotides (amorces) et températures d'hybridation utilisées lors du géotypage de l'ADN parasite.

3-2. METHODES

Dans notre travail, nous avons utilisé les techniques usuelles de biologie moléculaire, requises pour détecter les différentes mutations connues ou inconnues des différents gènes d'intérêt. Nous avons donc mis au point les techniques de polymorphismes de restriction, de polymorphisme par mutation dirigée, de séquençage et de clonage moléculaire. L'ADN utilisé, a été auparavant extrait par la méthode Phénol-Chloroforme.

3-2-1. Extraction d'ADN génomique

Elle se réalise en 2 étapes :

- Préparation d'un culot de globules blancs par lyse préférentielle des globules rouges

A partir de 10 ou 20 ml de sang total prélevé dans un tube EDTA, le plasma est éliminé par centrifugation. La solution lysante (NH_4HCO_3 0,9mM; NH_4Cl 31mM) permet l'éclatement des globules rouges qui sont ensuite éliminés par centrifugation.

- Extraction proprement dite par méthode Phénol-Chloroforme

Un mélange détergent (SSC 2X + 3% SDS) est utilisé pour obtenir l'éclatement des globules blancs, alors que la libération d'ADN nucléaire dans le milieu et la digestion des protéines associées sont réalisées par l'action de la protéinase K incubée à 37°C toute la nuit. Ensuite l'addition de phénol dénature les protéines et, surtout, les sépare des acides nucléiques. L'addition de Chloroforme-Octanol permet d'éliminer les traces de phénol, inhibitrices des enzymes utilisées plus tard. La séparation des phases organique et aqueuse se réalise par centrifugation. L'addition d'éthanol à froid permet de précipiter l'ADN génomique sous forme de "méduse". L'ADN est repris par une solution de tampon TE (Tris 10mM; EDTA 0,1-1mM) pour être conservé en évitant les risques de digestion par des nucléases contaminatrices.

3-2-2. Polymorphismes de restriction (RFLP)

La détermination des polymorphismes de restriction ou RFLP (restriction fragment length polymorphism) permettant la caractérisation des mutations connues, s'effectue en 2 étapes :

- Amplification élective *in vitro* de fragments d'ADN par PCR

L'amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN par la technique de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR ou polymerase chain reaction) permet d'obtenir en grande quantité des fragments d'ADN de longueur et de séquences déterminées à partir d'une faible quantité de matrice complexe. La PCR est l'amplification exponentielle d'un fragment d'ADN délimité par 2 séquences connues sur lesquelles s'hybrident spécifiquement et de manière opposée, 2 oligonucléotides de synthèse (amorces).

Pour toutes nos PCR, les réactions d'amplification sont effectuées sur un thermocycleur Perkin avec un volume réactionnel de 100µL comprenant de l'eau, un ADN double brin (0,5-1 µg), 2 amorces (sens et anti-sens 0,1-1 mM), les 4 types de bases (4 dnTP à 10 mM), l'enzyme Taq polymerase (0,5-1 unité), le tampon 10X (5-10µL) et éventuellement du magnésium (MgCl₂). Ce mélange est ensuite soumis à un programme comprenant une étape de dénaturation à 95°C (7 min), 30 cycles de dénaturation-hybridation-extension et une dernière étape d'extension à 72°C (5 min).

Les produits d'amplification sont contrôlés par une électrophorèse en gel d'agarose à 1%.

- Clivage de fragments d'ADN par des enzymes de restriction

Les polymorphismes de restriction sont des variations de séquences nucléotidiques qui créent ou abolissent des sites de reconnaissance des enzymes de restriction. Ils sont de nature bi-allélique car ils correspondent à la présence ou à l'absence du site de restriction.

Une fois le site de restriction répertorié et l'endonucléase de restriction déterminée, nous avons toujours effectué la réaction de digestion dans un volume final au moins 10 fois

supérieur au volume d'enzyme utilisé. Cette condition est respectée pour éviter que le glycérol, solvant des enzymes de restriction, ne soit présent au-delà de 5% en volume, ceci pouvant lui permettre d'inhiber l'enzyme ou de modifier sa spécificité. Pour un volume réactionnel final de 20 μ L, on a donc le produit PCR (ADN 1 μ g), l'enzyme (4 Unités), le tampon d'incubation 10X (2 μ L) et l'eau en quantité suffisante pour (qsp 20 μ L). L'ensemble est mis à incuber 2 heures minimum, sous huile pour éviter l'évaporation.

Après la digestion, la séparation des produits est réalisée par électrophorèse en gel d'acrylamide. En fonction de la taille des fragments recherchés, le gel d'acrylamide utilisé est dosé de façon à faire évoluer sa trame, qui peut être de soit 10% (fragments 0-120bp), 8% (40-400bp) ou 5% (65-1000bp).

3-2-3. Polymorphisme de restriction par mutagenèse dirigée (SDM)

Cette technique est une variante de la RFLP et la différence entre les deux approches, réside au niveau des amorces utilisées lors de la PCR. On parle de mutagenèse dirigée par les oligonucléotides de synthèse car il y'a une substitution provoquée d'une seule base dans la séquence de l'ADN. En effet, le polymorphisme étudié et recherché n'entraînant pas normalement la création ou l'abolition d'un site de restriction, l'on a recours à l'introduction d'une mutation ponctuelle désirée à un endroit voulu, de telle sorte qu'un site de restriction soit modifié si le dit polymorphisme a lieu.

Utilisant des amorces mutées, cette technique est délicate et demande à être éprouvée avant d'être utilisée en routine, notamment en ce qui concerne les conditions de la PCR (faible stringence). Nous avons utilisé cette technique pour le génotypage des polymorphismes du gène TNF- α (-308, -238 et -244) et des allèles MBL-R52C et CD1E*05.

3-2-4. Séquençage

Nous avons effectué la détermination de la séquence, ou séquençage, de manière manuelle par la méthode de Sanger pour les nouveaux variants MBL et CCR5, et de manière automatique par le séquenceur ABI Prism pour les polymorphismes du gène CD1E.

Le séquençage par la méthode enzymatique (Sanger) est basé sur l'arrêt de l'élongation *in vitro* d'ADN par l'addition de di-désoxyribonucléotides. Pour le réaliser, nous avons utilisé le kit T7 Sequenase version 2.0 PCR product (Amersham Life Science), et effectué 2 groupes de manipulations.

- Les réactions de séquence

Le produit d'amplification est d'abord traité par les enzymes exonucléase et phosphatase alcaline afin d'éliminer les amorces et les nucléotides restants de la précédente PCR. A l'aide d'une amorce (choisie en fonction de la région qu'on veut séquençer), l'hybridation va se réaliser après une étape de dénaturation. La synthèse du second brin d'ADN est réalisée par la sequenase en présence des 4 désoxyribonucléotides mais aussi du Soufre 35 radioactif. Quatre réactions de séquence sont menées en parallèle, chacune comportant l'une des 4 bases sous forme de di-désoxyribonucléoside triphosphate (forme arrêtant l'élongation). La réaction de terminaison ou élongation effectuée à 37°C, est stoppée définitivement par ajout de formamide.

- La migration et la révélation

Après dénaturation, les produits de séquence sont mis à migrer dans un gel dénaturant d'acrylamide à 6%. La durée de migration de ce gel résolutif dépend de la zone de lecture prédéfinie. Après la migration, la taille des fragments est détectée par autoradiographie.

La longueur des séquences qu'on peut déterminer par cette technique, varie de 300 à 800 bases selon la longueur et la qualité du gel d'électrophorèse utilisé.

3-2-5. Clonage moléculaire

Le clonage moléculaire permet d'obtenir un grand nombre de copies pures d'une séquence donnée d'ADN. Cette recombinaison *in vitro* d'un fragment d'ADN s'effectue grâce à un vecteur (plasmide dans notre cas) qui se réplique de manière autonome à l'intérieur d'une cellule hôte. La sélection et la culture de cette cellule permettent l'isolement de l'ADN inséré à l'état pur et en grandes quantités.

Techniquement, le clonage a été réalisé à l'aide du kit TA Cloning (Invitrogen Corp.) contenant des polymérases thermostables qui permettent une ligation efficace avec le vecteur, grâce à l'ajout d'une désoxyadénosine. Deux grandes étapes de manipulations sont réalisées :

- Ligation et transformation

Le fragment d'ADN sélectionné et purifié subit une réaction de ligation à 14°C pendant toute une nuit dans un mélange réactionnel comprenant la T4 ligase, le tampon, l'ADN et le vecteur. La transformation a lieu par l'infection des bactéries qui sont ensuite étalées en milieu solide Agar-LB-Ampicilline en présence de X-gal et incubées à 37°C toute une nuit. L'amplification de la banque d'ADN se réalise par remise en culture des bactéries 'blanches' (ayant l'ADN à cloner) à 37°C toute une nuit.

- Extraction et analyse de l'ADN plasmidique

Le culot de bactéries obtenu à la suite de centrifugations, est re-suspendu dans différentes solutions du kit d'extraction. L'extraction de l'ADN plasmidique se fait par la méthode traditionnelle Phénol-Chloroforme. La vérification de l'existence et de la taille de l'ADN inséré, s'effectue par une digestion avec l'enzyme *EcoRI* en présence de RNase, qui est suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose.

4. RÉSULTATS

Les résultats de cette première partie de notre étude, ont fait l'objet de 3 publications et d'un manuscrit soumis à publication. Ils sont présentés en 2 parties. La première partie est axée sur les facteurs génétiques déjà évoqués pour influencer l'infection palustre. La seconde partie concerne les variants génétiques des molécules présentatrices d'antigènes, dont nous avons, pour la première fois, analysé la relation avec l'infection à *Plasmodium falciparum*.

4-1. FACTEURS GÉNÉTIQUES DE L'HÔTE EN RELATION AVEC L'INFECTION PALUSTRE

Les résultats présentés proviennent de 2 études d'associations. La première étude analyse la relation entre les facteurs génétiques humains (Hémoglobine AS, Système ABO, Déficience en G6PD, TNF- α , NOS2 et MBL) et l'infection palustre simple. Ensuite, la seconde étude traite, pour la première fois, du lien entre ces mêmes facteurs et l'infection palustre asymptomatique.

4-1-1. Facteurs génétiques et infection palustre simple

L'analyse de la relation facteurs génétiques de l'hôte africain et infection palustre simple, a fait l'objet de la publication suivante :

Migot-Nabias F, **Mombo LE**, Luty AJ, Dubois B, Nabias R, Bisseye C, Millet P, Lu CY, Deloron P. Human genetic factors related to susceptibility to mild malaria in Gabon. *Genes Immun* 2000 Oct;1(7):435-441.

Cette étude de 300 enfants gabonais en âge scolaire, a révélé plusieurs associations entre les facteurs génétiques de l'hôte et les aspects cliniques, parasitaires et immunologiques de l'infection simple à *Plasmodium falciparum*.

- Ainsi, la présence du groupe sanguin O, a été associée à une densité parasitaire faible ($P = 0,043$), ce qui signifie un contrôle plus efficace du développement des parasites par les sujets de groupe sanguin O.

- Les enfants porteurs du trait drépanocytaire, présentent de manière statistiquement significative ($P = 0,031$), des densités parasitaires élevées. La protection contre l'infection palustre chez les sujets possédant l'hémoglobine AS, n'est pas retrouvée. En effet, les enfants qui portent l'hémoglobine AA, présentent moins d'accès simples de paludisme que ceux qui possèdent l'hémoglobine AS, dans cette première analyse ($P = 0,0001$).

- Le résultat le plus important est l'association, pour la première fois, entre l'allèle TNF- α -238A et un titre élevé d'anticorps dirigés contre un peptide de MSA-2 ($P = 0,008$), mais aussi contre un peptide de RAP-1 (rhoptry-associated protein-1; $P = 0,009$). Cette association est un argument intéressant, qui permet de situer l'effet protecteur de cet allèle au niveau du cycle asexué érythrocytaire, précisément en induisant l'augmentation des anticorps.



Human genetic factors related to susceptibility to mild malaria in Gabon

F Migot-Nabias¹, LE Mombo¹, AJF Luty^{1,2}, B Dubois³, R Nabias¹, C Bisseye¹, P Millet^{1,4}, CY Lu^{1,5} and P Deloron¹

¹Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Gabon; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 13 and Institut de Médecine et d'Epidémiologie Africaines (IMEA), CHU Bichat, Paris, France

Several human genetic factors, including red blood cell polymorphisms (ABO blood group, sickle-cell trait, G6PD deficiency) as well as point mutations in the mannose binding protein (MBP) and in the promoter regions of both the TNF- α and NOS2 genes, influence the severity of disease due to infection with *Plasmodium falciparum*. We assessed their impact on mild *P. falciparum* malaria, as part of a longitudinal investigation of clinical, parasitological and immunological parameters in a cohort of 300 Gabonese schoolchildren. We found the following frequencies: blood group O (0.54), sickle-cell trait (0.23), G6PD deficiency (0.09), MBP gene mutations (0.34), TNF- α promoter mutations (at positions -238: 0.17 and -308: 0.22) and NOS2 promoter mutation (0.18). Blood group O or hemoglobin AA were associated with protection against higher parasitemia. Girls with normal G6PD enzyme activity were protected against clinical malaria attacks. In addition, we demonstrated for the first time that the mutation at position -238 of the gene coding for the promoter region of TNF- α was positively correlated with the level of the antibody response specific for epitopes of the antigens MSA-2 and RAP-1 of *P. falciparum*. Genes and Immunity (2000) 1, 435–441.

Keywords: Gabon; genetic polymorphisms; immunity; malaria; *Plasmodium falciparum*

Introduction

For some years it has been clear that the genetic determination of malaria susceptibility in humans is highly polygenic, as it is for many infectious diseases. Genetic polymorphisms of the innate immune system and of the erythrocyte have namely been proposed as factors protecting against severe malaria.¹ A better knowledge of the polymorphic host genes associated with resistance to clinical malaria and/or with high parasite densities might provide new insights into disease mechanisms, and suggest new approaches for prophylactic or therapeutic interventions.² Although several host genetic factors related to resistance to severe malaria (cerebral malaria, severe anemia) have convincingly been listed,³ the same is not the case for the mild expression of the disease.⁴ Indeed, concerning red blood cell polymorphisms for example, no study has revealed any influence of ABO blood groups on the susceptibility to mild

malaria⁵ nor on the delay of reinfection after curative anti-malarial treatment.⁶ Although sickle-cell trait protects against severe malaria and reduces susceptibility to mild malaria,⁷ it does not appear to prevent *Plasmodium falciparum* infection. Lastly, the geographical overlap between the distribution of G6PD deficiency and the endemicity of malaria has suggested that G6PD deficient subjects might be protected against malaria, but field studies have yielded conflicting results.^{8–10} Polymorphisms of components of the inflammatory response have been investigated more recently, and among them, polymorphisms in the promoter region of the TNF- α gene are the most widely studied. Results from different study sites have varied in their ability to demonstrate an impact on the clinical outcome of *P. falciparum* infection.^{11–13} In all these studies, the TNF- α promoter polymorphisms appear to be related to severe expression of the malarial disease, but not to mild malaria.

We undertook a prospective longitudinal study, over a 1-year period, in schoolchildren living in an area of Gabon where malaria is highly endemic, in order to examine the relationships between malaria prevalence and malaria-related morbidity.¹⁴ We revealed in the same cohort several associations between disease susceptibility and immune responses directed to synthetic peptides of *P. falciparum* asexual blood stage antigens,¹⁵ as well as the presence of genetic regulation via the locus HLA-A, and of specific immune responses directed to epitopes of Liver Stage Antigen-1 (LSA-1) of *P. falciparum*.¹⁶ In the present study, we determined the prevalence rates of several red blood cell genetic polymorphisms (blood group, sickle cell trait, G6PD) which are known to be present at significant frequencies in sub-Saharan Africa.⁴ We also

Correspondence: Florence Migot-Nabias, CIRMF, BP 769, Franceville, Gabon. E-mail: migot_nabias@yahoo.com

²Present address: Institut für Tropenmedizin, Wilhelmstrasse 27, 72074 Tübingen, Germany

⁴Present address: University Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France

⁵Present address: Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, New York 10461, USA

This study was partially supported by an INSERM North-South Network grant (No. 94/NS01). The Centre International de Recherches Médicales de Franceville is financially supported by the government of Gabon, Elf Gabon and the Ministère Français des Affaires Etrangères.

Received 7 March 2000; revised and accepted 21 June 2000

investigated the more recently described genetic polymorphisms of selected components of the inflammatory response, including polymorphisms of promoter regions of TNF- α and NOS2, and of the mannose binding protein (MBP). Lastly, we analyzed the relationships between these genetic factors and clinical or parasitological presentation of *P. falciparum* mild malaria, as well as specific immune responses characterized by antibody responses directed to peptides from *P. falciparum* asexual blood stage antigens.

Results

This study aimed to investigate the relationships between several host genetic factors and the clinical, parasitological and immunological status *vis-à-vis* *P. falciparum* malaria in the school-going population of 300 children in the Gabonese village of Dienga. In the whole population sample, prevalence rates of ABO blood groups (group O: 54%, group A: 27%, group B: 17% and group AB: 1%) and sickle-cell trait (23%) were evaluated. Concerning G6PD, 60 subjects (22%) presented the allele A-, and at least 24 of them (9% of the whole cohort) were phenotypically deficient in G6PD as they included 22 hemizygote males and two homozygote females. Gene polymorphisms in the promoter region of TNF- α revealed prevalence rates of 17% (for TNF₋₂₃₈ A allele) and 22% (for TNF₋₃₀₈ A allele) of children harboring mutations, mainly in the heterozygous state as only 1.9% and 2.3% of children were homozygous for these mutations, respectively. A point mutation in the promoter region of NOS2 was present in 18% of children, mainly in the heterozygous state (except for two children). At least one MBP gene mutation was present in 34% of the children, with an overall gene frequency of 0.02 and 0.16 for mutations at codons 54 and 57, respectively.

The mean geometric parasite density (95% confidence interval) of the 1036 positive blood smears detected among the totality of the smears collected during 16 cross-sectional surveys for the detection of asymptomatic infections was low, with 203 (180–230) *P. falciparum* parasites per μ l of blood. The individual ability to control the parasite density was expressed by the geometric mean of date- and age-adjusted parasitic densities (GMAPD), as presented in Table 1. GMAPD were lower in children with blood group O than in those with non-O blood groups (Student's unpaired *t*-test, $P = 0.043$). Clinical and parasitological data did not differ when comparing children with and without blood group A, the second most prevalent blood group in the population sample. Children carrying sickle-cell trait presented higher GMAPD compared to those with normal hemoglobin (Student's unpaired *t*-test, $P = 0.031$). This was accompanied by a higher mean prevalence rate of *P. falciparum* infection determined during the 16 cross-sectional surveys among HbAS (34.5%) than HbAA (26.8%) children (Chi-square test, $P < 0.0001$). We revealed a trend for those with both blood group O and AA haemoglobin to harbour lower parasite densities than other individuals ($n = 106$, Student's unpaired *t*-test, $P = 0.055$). This trend was reinforced when considering children ≤ 10 years of age ($n = 53$, Student's unpaired *t*-test, $P = 0.045$).

The distribution of host genetic types among clinically-classified children showed that females tended to be

more protected than males (Chi-square test, $P = 0.06$), and after having split our cohort into two age classes, including children ≤ 10 years ($n = 164$) and children > 10 years ($n = 136$), this difference was found significant among females > 10 years (Chi-square test, $P = 0.015$). Carriers of the G6PD A- allele were more frequent among unprotected than protected females (Chi-square test, $P = 0.026$). This relation was confirmed when restricted to heterozygote G6PD A-/A females, ie, two and seven individuals in protected and unprotected groups, respectively (Chi-square test, $P_{corrected} = 0.038$). The fact that females tended to be more protected than males appeared to be attributable to their normal G6PD genotype ($n = 31$ both protected and non-G6PD deficient females, Chi-square test, $P = 0.002$), no difference being observed between females and males with mutated G6PD genotypes.

The analysis of the relationships between host genetic factors and anti-peptide antibody responses is presented in Table 2, and revealed higher levels of antibodies to NTSDSQKE (peptide from MSA-2) and LTPLEELYP (peptide from RAP-1) in subjects presenting the TNF₋₂₃₈ A allele than in others (Mann-Whitney *U*-test, $P = 0.008$ and $P = 0.009$, respectively). When taking age into account, this observation was confirmed for children > 10 years (Mann-Whitney *U*-test, $P = 0.033$ and $P = 0.013$, respectively).

Discussion

The present study among 300 schoolchildren from the Gabonese village of Dienga revealed several associations between host genetic factors and either the clinical, parasitological or immunological status of the children as regards *P. falciparum* malaria. Namely, the presence of blood group O or hemoglobin AA was associated with more efficient control of parasite multiplication. Girls with normal G6PD activity were protected against clinical malaria. Lastly, the mutation at position -238 of the gene coding for the promoter region of TNF- α was related to a higher antibody response to epitopes of the antigens MSA-2 and RAP-1 from *P. falciparum*. Explanations for these observations are discussed according to the nature of the genetic factors investigated, ie, red blood cell polymorphisms as well as polymorphisms of several components of the inflammatory response.

Two earlier studies conducted in Zimbabwe¹⁷ and Gabon⁵ have shown that patients with blood group A were at a significantly greater risk for severe malaria than others. Conversely, a small but significant association of blood group O with resistance to severe malaria was found in The Gambia.⁴ The association of rosetting rates with severe malaria, and the fact that rosette formation is more common with blood group A¹⁸ and less common with blood group O,¹⁹ may offer an explanation for these observations, or may simply indicate other host-parasite interactions yet to be defined. Although conflicting results have been obtained concerning the influence of blood groups on parasite densities,^{5,20} we did observe lower parasite densities in those with blood group O compared to non-O subjects, substantiating the argument for a protective effect of blood group O against *P. falciparum* malaria.

The absence of any relationship between sickle-cell trait and clinical protection among our cohort with a mean age of 10 years was not surprising, since this gen-

Table 1 Characteristics of children according to their clinical and parasitologic status towards *P. falciparum* malaria in Dienga, Gabon

Genetic factors		Clinical protection				Parasite density			
		Yes	No	n	P ^a	GMAPD ^b	n	P ^c	
Sex	male/female	35/41	50/32	158	0.06	0.99 (0.84–1.18)/1.02 (0.83–1.26)	275	0.82	
Blood group	O/non O	38/33	43/30	144	0.51	0.87 (0.74–1.03)/1.15 (0.93–1.43)	255	0.043	
Hb phenotype	AA/AS	55/15	58/14	142	0.77	0.92 (0.79–1.07)/1.32 (0.96–1.81)	253	0.031	
G6PD genotype ^d	female: normal/mutation	31/5	16/10	62	0.026	0.99 (0.78–1.25)/1.10 (0.69–1.75)	110	0.67	
	male: normal/mutation	24/6	41/6	77	0.59	1.06 (0.87–1.28)/0.80 (0.48–1.32)	144	0.29	
TNF- α polymorphism ^e :									
	TNF ₋₂₃₈ A allele	absence/presence	50/14	60/12	136	0.44	0.99 (0.84–1.15)/1.26 (0.89–1.77)	245	0.21
	TNF ₋₃₀₈ A allele	absence/presence	48/15	58/15	136	0.65	1.04 (0.89–1.22)/0.92 (0.68–1.24)	248	0.46
	NOS2 genotype ^e	normal/mutation	28/10	27/3	68	0.09	0.92 (0.74–1.13)/1.29 (0.79–2.10)	114	0.19
	MBP genotype ^f	normal/mutation	38/26	46/27	137	0.66	1.05 (0.88–1.25)/0.91 (0.72–1.13)	241	0.31

^aP (or P_{corrected}) value of the chi-square test. ^bGeometric mean (95% CI) of the GMAPD (geometric mean of the adjusted parasite densities). ^cP value of the Student's unpaired t-test applied to log-transformed GMAPD values. ^dG6PD mutations include G6PD A-/B, A-/A heterozygous and A-/A- homozygous females, as well as G6PD A- hemizygous males. ^eMutation indicated in both heterozygous and homozygous states. ^fMBP mutations include heterozygous, di-heterozygous as well as homozygous individuals for at least one of the codons 54 or 57.

Table 2 Relationships between TNF₋₂₃₈ A allele and antibody responses to peptides from *P. falciparum* asexual blood stage antigens

Antibody responses (AU) ^a	TNF ₋₂₃₈ A allele		P ^c
	Absence (n = 171)	Presence (n = 36) ^b	
NTSDSQKE (from MSA-2)	2.9 (0.0–26.0)	24.1 (1.0–44.3)	0.008
LTPEELYP (from RAP-1)	10.1 (0.0–29.0)	23.7 (5.3–48.7)	0.009

^aAntibody values are medians (25th percentile–75th percentile). ^bTNF₋₂₃₈ A allele present in both heterozygous and homozygous states. ^cP value of the Mann-Whitney U-test.

etic trait has its principal impact during the first years of life, before the superposed effect of acquired immunity.²¹ Indeed, in asymptomatic children, mean parasite densities have been shown to be higher in HbAS than HbAA children less than 5 years old,²² but similar in older individuals.^{23–25} In the present study, higher GMAPD values in HbAS children may in part be attributed to the higher mean prevalence rate of *P. falciparum* infection among these children during the 16 cross-sectional surveys. Moreover, in holoendemic areas of Ghana²⁶ and The Gambia,²⁷ children with a moderate parasite count (less than 50/ μ l in Ghana and 500/ μ l in The Gambia) as observed in our sample, were more commonly seen among HbAS than in HbAA controls.

Conversely to sickle-cell trait, the implication of G6PD deficiency in protection against malaria has never been clearly established. G6PD is a cytoplasmic enzyme, allowing cells to withstand oxidant stress, that is encoded by the probably most polymorphic gene in humans, located on the X chromosome. In Africa, G6PD is represented by three major variants, G6PD B (normal), G6PD A (90% enzyme activity) and G6PD A- (12% enzyme activity).²⁸ A large case-control study revealed an association between G6PD A- and a significant reduction in the risk of severe malaria for both G6PD female heterozygotes and male hemizygotes.¹⁰ Other results suggested that female heterozygotes, but not male hemizygotes

were protected against high parasite densities in Nigerian children with acute malaria,⁸ and more precisely, that only G6PD A-/B heterozygote females gained an advantage against morbidity rates and parasitemia.²⁹ Unfortunately, this finding could not be further corroborated in the same population,⁹ and it was rather suggested that protection against malaria was not afforded by G6PD deficiency itself, but by a related phenomenon to be identified.³⁰ In the present study, no difference, either in susceptibility to malaria attack or in the ability to control parasite density was revealed between normal and G6PD A- males, thus confirming some previous data.^{8,9} It was, however, striking to observe that heterozygote G6PD A-/A females were more likely to present with a malaria attack than their G6PD non-deficient counterparts. This finding suggests that the G6PD A-/A heterozygote combination may be a susceptibility factor for clinical malaria, rather than an inoperative genetic factor.²⁹ It is however difficult to draw decisive conclusions for several reasons. Firstly, the small sample size of females did not allow a determination of the presence of possible linkage between the G6PD locus and other genetic factors which may be involved.³⁰ Secondly, the location of the G6PD gene on the X chromosome and the subsequent variable X-chromosome inactivation, implies that the expression of G6PD deficiency differs markedly among heterozygote females,³¹ and therefore that these females do not constitute a homogeneous group.

We investigated the impact of polymorphisms of products of the inflammatory response on susceptibility to mild malaria by assessing known polymorphisms in the TNF- α and NOS2 gene promoter regions, as well as in the MBP gene. TNF- α is a proinflammatory cytokine that provides rapid host defense against infection but is detrimental or fatal in excess. Support for the role of TNF- α in the pathogenesis of malaria lies in the finding that polymorphisms in the promoter region of the TNF- α gene govern the outcome of infection in terms of disease severity, although there are conflicting results from different study sites. Thus, a G to A point mutation at position -238 relative to the TNF- α transcriptional start site has recently been found to be associated with severe malarial anemia in The Gambia,¹² but with protection

from cerebral malaria in Kenya.¹¹ The G to A point mutation at position -308, another TNF- α gene polymorphism frequently encountered in sub-Saharan Africa, is related to an increased risk of cerebral malaria in homozygotes in The Gambia,³² and in heterozygotes in a more recent study in Sri Lanka.¹³ In all these studies, TNF- α promoter polymorphisms were related specifically to severe but not mild malaria, which is consistent with the absence, in our study, of differences between children classified either according to their clinical status or to their ability to control *P. falciparum* parasite densities. Hitherto TNF- α gene expression has not been related to any variation in cytokine production, thus the -238 and -308 polymorphisms may serve as markers for a functional polymorphism elsewhere in the TNF- α gene or in another immunologically relevant gene situated nearby.¹² TNF- α is also critical in the development of the humoral response as an autocrine B cell growth factor,³³ representing an important mediator of B cell regulation during several parasitic diseases including malaria.³⁴ In our study, the TNF- α A allele was linked to high levels of plasma antibodies directed to peptides NTSDSQKE and LTPLEELY from the MSA-2 and RAP-1 antigens of *P. falciparum*, respectively. It is of particular note that clinically protected children in the same cohort presented higher specific antibody levels to these same peptides, but not to others, compared with unprotected children.¹⁵ Although the TNF- α A allele was not directly related to clinical protection against mild malaria (Chi square test, $P > 0.05$), this genetic polymorphism could be involved in protection against mild disease through its influence on the production of protective antibodies to asexual blood stages. This is the first time that a defined TNF- α gene promoter polymorphism has been found to be related to enhanced antibody responses to specific malarial antigens. We would propose one of two possible explanations for this finding. Firstly, a second polymorphism, TNF- α A, which is frequently found in linkage disequilibrium with TNF- α A, is related to enhanced secretion of TNF¹¹ and might be responsible for increased antigen- or T-cell-mediated B-cell stimulation and proliferation.³³ Alternatively, the TNF- α A allele may preferentially induce TNF- α in its soluble rather than its membrane-bound form. These different forms of TNF- α bind to different TNF receptors named TNFR1 (soluble form) and TNFR2 (membrane-bound form).³⁴ Interestingly, it was recently demonstrated that a full IgG response, mainly mediated by follicular dendritic cells, depends on a signal delivered through TNFR1.³⁵ Whether mediated by quantitative or qualitative changes in TNF- α production, the relationship we have described here between the TNF- α A allele and enhanced antimalarial antibody levels, themselves associated with clinical protection, is a novel one. Its significance in the context of vaccine development, however, remains to be clarified, because of the highly complex regulatory mechanisms controlling the synthesis of this cytokine, which can have both beneficial and deleterious effects for the human host.

Another polymorphism of interest with regard to susceptibility to malaria is that of the promoter region of NOS2. Carriers of the point mutation at position -969 of this region tended to be clinically protected, confirming the presence of an association between this polymorphism and a decreased severity of disease as well as of

a prolonged time to first reinfection.³⁶ Conversely, polymorphisms in a microsatellite region in the promoter region of NOS2 have been associated with fatal cerebral malaria.³⁷ These genetic studies have led to similarly conflicting results as have biological observations, according to which nitric oxide (NO) was first identified as a potential cause of neurosuppression leading to cerebral malaria.³⁸ However, increased expression of NOS2 in PBMC, and particularly in monocytes,³⁹ leading to increased NOS2-derived NO synthesis, is associated with protection against clinical disease.⁴⁰ It seems therefore too early to establish a definitive causal association between NOS2 polymorphisms and malaria susceptibility.

MBP is a member of the collectin family of proteins, which are constituents of the innate immune system, acting therefore against multiple pathogenic organisms.⁴¹ MBP is thought to be more effective at an early age, before effective acquired immune responses have developed, and low plasma concentrations of non-functional MBP have been attributed to mutations in the coding region of the MBP gene.⁴² The frequencies of MBP gene mutations in our population are consistent with those reported in a case-control study conducted in a different area of Gabon, showing that MBP gene mutations are present at a higher frequency in young children with severe rather than mild malaria.⁴³ In the study reported here, we could find no difference in the distribution of MBP mutations according to the clinical or parasitological status of the subjects, confirming previous findings.⁴⁴ This could reflect the fact that our study focused on mild rather than severe malaria, and on an older age-group of children compared with the other Gabonese study.⁴³

Overall, in this study we have demonstrated that blood group O and hemoglobin AA are associated with protection against parasite multiplication, and that girls with normal G6PD activity are protected against clinical malaria. In addition, we found that the mutation at position -238 of the promoter region of the TNF- α gene was related to higher levels of antibodies specific for epitopes of the antigens MSA-2 and RAP-1 of *P. falciparum*. We have to take into account that interactions between host and parasite polymorphisms contribute to add a further layer of complexity in the associations described here. Namely, a previous work performed on genetic polymorphisms of *P. falciparum* among asymptomatic children from the same Gabonese cohort, demonstrated that sickle-cell trait carriers harbored more multiple *P. falciparum* parasite genotypes,⁴⁵ which allelic distribution, based on the analysis of MSP-1 gene polymorphism, was different as compared with HbAA children.⁴⁶ These particular associations might be able to affect disease susceptibility. Clearly, host genetic factors have weaker and less influential effects on mild compared with severe malaria, and their impact is thus more difficult to demonstrate in epidemiological studies. This is reflected in the fact that the data presented here are not completely consistent with those reported in previous studies of severe malaria, which further underscores the complexity of host resistance to falciparum malaria.

Materials and methods

Study area

The study was conducted in Dienga, a village of 1200 inhabitants located in South Eastern Gabon, near the

Congo border. This village is situated in a rain forest area, and malaria is highly endemic with peaks of transmission occurring at the end of the rainy seasons from December to March and in July–August (Elissa N, unpublished data).

Subjects

A clinical, biological and parasitologic follow-up, details of which have been described elsewhere,¹⁴ was carried out from February 1995 to March 1996 (except during the school summer holidays) among the 300 children (169 males and 131 females, mean age \pm s.d. = 10.4 ± 2.7 years) attending the primary school in Dienga. Clinical data allowed protected and unprotected children to be distinguished. Protected children ($n = 76$) were defined as those who, during the whole survey period, never presented with a febrile episode (defined by an axillary temperature $>37.5^\circ\text{C}$) associated with either a *P. falciparum* parasitemia $>400/\mu\text{l}$ or 4-aminoquinoline metabolites in their urine.⁴⁷ Unprotected children ($n = 82$) were defined as those who presented with at least one malaria attack, defined by the association of fever with *P. falciparum* parasitemia $>5000/\mu\text{l}$. The other children ($n = 142$) remained unclassified. After obtaining informed consent from all individuals and/or their parents, venous blood samples were collected into Vacutainer EDTA tubes at the beginning of the follow-up for the determination of human genetic factors ($n = 279$ children) and at the end of the follow-up period for the immunologic assays ($n = 229$ children). Ethical clearance for the study was given by the local ethic committee, the Ministry of Public Health, the Governor of the Province, and the local Prefet.

Parasitologic measurements

During the follow-up, 16 twice-a-month thick blood smears were prepared for the detection of asymptomatic malaria infection. All thick blood smears were Giemsa-stained and examined against 200 leukocytes if positive or against 400 leukocytes prior to be declared negative. Parasite densities (PD) were recorded as the number of parasites/ μl of blood, assuming an average leukocyte count of $8000/\mu\text{l}$. Each value of PD was simultaneously adjusted to age and date of sampling by calculating the ratio of the individual parasite density (PD+1) to the geometric mean of all (PD+1) values recorded at each date of sampling in the group of children of same age. For each child who presented at least six recorded thick blood smears ($n = 275$ children), the GMAPD was calculated. For the need of the statistical analysis, log-transformed values of the GMAPD were considered.

Human genetic factors

At initiation of the study, blood group was determined by serology and sickle-cell trait was detected by hemoglobin electrophoresis. Gene polymorphisms of G6PD, MBP as well as those of TNF- α and NOS2 promoter regions were analyzed at the molecular level, using different methods based on PCR techniques.⁴⁸ The common African G6PD A- allele, as well as polymorphisms in the promoter regions of both TNF- α and NOS2 genes were detected by PCR-RFLP methods. Each mutation created or abolished a specific restriction enzyme site. The primers and enzymes used in this study are listed in Table 3. Mutations in codons 54 and 57 of MBP were detected by the DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) method as described elsewhere.⁴⁹

Antibody measurements

Five synthetic peptides were used, representing B cell epitopes from conserved and semi-conserved regions of *P. falciparum* asexual blood stages. These peptides were purchased from the Pasteur Institute (Paris, France) and were LNDITKEYEKLLEI (residues 521–535) from the merozoite surface antigen-1 (MSA-1), SNTFINNA (residues 27–34) and NTSDSQKE (residues 213–220) from the merozoite surface antigen-2 (MSA-2), LTPLEELYP (residues 202–210) from the rhoptry-associated protein-1 (RAP-1), and K(EENVEHDA)₄ (residues 892–924) from the Pf155/ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA). Anti-peptide antibodies were tested by ELISA, as previously described.¹⁵ Results were expressed in arbitrary units (AU) according to reference positive and negative control plasmas, and the thresholds for positivity were set at 19.1 AU for LNDITKEYEKLLEI, 2.9 AU for SNTFINNA, 7.7 AU for NTSDSQKE, 10.5 AU for LTPLEELYP and 29.2 AU for K(EENVEHDA)₄, as determined from the mean reactivities $+2$ s.d. of >50 plasmas from non-immune subjects.

Statistical analysis

Differences in proportions were analyzed using Chi square test or Fisher's exact test according to sample sizes. Differences in means were tested by Student's unpaired *t*-test on linear or log-transformed values. When variable distribution was not normalized by log-transformation, the non-parametric Mann-Whitney *U*-test was employed. Statview 4.5 (Abacus Concept, Berkeley, CA, USA) was used for these calculations. For all tests, *P* values <0.05 were considered significant.

Table 3 Oligonucleotide primers and enzymes used for the determination of human genetic polymorphisms

Genes	Primers	Annealing temperature ($^\circ\text{C}$)	Mutations	Enzymes ^a
G6PD	Upper: 5'-CTGCGTTTTCTCCGCCAATC-3'	60	376 A→G	FokI (+)
	Upper: 5'-TTACAGCTGTGCCCTGCCCT-3'	60	202 G→A	NlaIII (+)
	Lower: 5'-AGGGCAACGGCAAGCCTTAC-3'			
TNF- α	Upper: 5'-GGCAATAGGTTTTGAGGG ^b C ^c CATG-3' ^h	58	-308 G→A	NcoI (-)
	Lower: 5'-CACACTCCCCATCCTCCCTG ^b A ^c TC-3'		-238 G→A	AlwI (-)
NOS2	Upper: 5'-TGTTGGGACGGTGAGATCAAGGT-3'	57	-969 G→C	BsaI (-)
Lower: 5'-CTCATCAAAGGTGGCCGAGAGAT-3'				

^aEach mutation creates (+) or abolishes (-) a specific restriction enzyme site. ^b " " , localisation of a mismatch.

Acknowledgements

We are indebted to the villagers and governmental administrative personnel of Dienga for their participation in this study, as well as to P Tshipamba and F Lekoulou for field assistance and to J Mayombo for technical assistance.

References

- 1 Wilkinson RJ, Pasvol G. Host resistance to malaria runs into swampy water. *Trends Microbiol* 1997; 5: 213–215.
- 2 Hill AVS. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 593–617.
- 3 Miller LH. Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Africans and African Americans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2415–2419.
- 4 Hill AVS. Malaria resistance genes: a natural selection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 225–226 and 232.
- 5 Lell B, May J, Schmidt-Ott RJ *et al*. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 794–799.
- 6 Domarle O, Migot-Nabias F, Mvoukani JL *et al*. Factors influencing resistance to re-infection with *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 926–931.
- 7 Hill AVS, Allsopp CEM, Kwiatkowski D *et al*. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991; 352: 595–600.
- 8 Bienzle U, Ayeni O, Lucas AO, Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of females heterozygous for enzyme deficiency and of males with non-deficient variant. *Lancet* 1972; I: 107–110.
- 9 Martin SK, Miller LH, Alling D *et al*. Severe malaria and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency: a reappraisal of the malaria/G-6-PD hypothesis. *Lancet* 1979; I: 524–526.
- 10 Ruwende C, Khoo SC, Snow RW *et al*. Natural selection of hemi and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 1995; 376: 246–249.
- 11 Knight JC, Udalova I, Hill AVS *et al*. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 1999; 22: 145–150.
- 12 McGuire W, Knight JC, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis* 1999; 179: 287–290.
- 13 Wattavidanage J, Carter R, Perera KLRL *et al*. TNF α *2 marks high risk of severe disease during *Plasmodium falciparum* malaria and other infections in Sri Lankans. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 350–355.
- 14 Deloron P, Ringwald P, Luty AJF *et al*. Relationships between malaria prevalence and malaria-related morbidity in school-children from two villages in Central Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 99–102.
- 15 Migot-Nabias F, Luty AJF, Ringwald P *et al*. Immune responses against *P. falciparum* asexual blood stage antigens and disease susceptibility in Gabonese and Cameroonian children. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 488–494.
- 16 Migot-Nabias F, Deloron P, Ringwald P *et al*. Immune response to *P. falciparum* liver stage antigen-1: geographical variations within Central Africa and their relationship with protection from clinical malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: in press.
- 17 Fisher PR, Boone P. Short report: severe malaria associated with blood group. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 122–123.
- 18 Udomsangpetch R, Todd J, Carlson J, Greenwood BM. The effects of hemoglobin genotype and ABO blood group on the formation of rosettes by *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 149–153.
- 19 Carlson J, Wahlgren M. *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosetting is mediated by promiscuous lectin-like interactions. *J Exp Med* 1992; 176: 1311–1317.
- 20 Akinboye DO, Ogunrinade AF. Malaria and loaisis among blood donors at Ibadan, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 398–399.
- 21 Guggenmoos-Holzmann I, Bienzle U, Luzzatto L. *Plasmodium falciparum* malaria and human red cells. II. Red cell genetic traits and resistance against malaria. *Int J Epidemiol* 1981; 10: 16–22.
- 22 Le Hesran JY, Pesonne I, Personne P *et al*. Longitudinal study of *Plasmodium falciparum* infection and immune responses in infants with or without the sickle cell trait. *Int J Epidemiol* 1999; 28: 793–798.
- 23 Marsh K, Otoo L, Hayes RJ, Carson DC, Greenwood BM. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 293–303.
- 24 Cot M, Abel L, Roisin A *et al*. Risk factors of malaria infection during pregnancy in Burkina Faso: suggestion of a genetic influence. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 358–364.
- 25 Rihet P, Abel L, Traoré Y, Traoré-Leroux T, Aucan C, Fumoux F. Human malaria: segregation analysis of blood infection levels in a suburban area and a rural area in Burkina Faso. *Genetic Epidemiol* 1998; 15: 435–450.
- 26 Ringelhan B, Hathorn MK, Jilly P, Grant F, Parniczky G. A new look at the protection of hemoglobin AS and AC genotypes against *Plasmodium falciparum* infection: a census tract approach. *Am J Hum Genet* 1976; 28: 270–279.
- 27 Allen SJ, Bennett S, Riley EM *et al*. Morbidity from malaria and immune responses to defined *Plasmodium falciparum* antigens in children with sickle cell trait in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 494–498.
- 28 Ruwende C, Hill A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med* 1998; 76: 581–588.
- 29 Bienzle U, Guggenmoos-Holzmann I, Luzzatto L. Malaria and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in West Africa. *Am J Trop Med Hyg* 1979; 28: 619–621.
- 30 Martin SK. The malaria/G6PD hypothesis revisited. *Parasitol Today* 1994; 10: 251–252.
- 31 Beutler E, Yeh M, Fairbanks VF. The normal human female as a mosaic of X chromosome activity. Studies using the gene for G-6-PD deficiency as a marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 1962; 48: 9–13.
- 32 McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371: 508–511.
- 33 Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeld AE. Tumor necrosis factor α is an autocrine growth factor for normal human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7007–7011.
- 34 Goldfeld AE, Tsai EY. TNF- α and genetic susceptibility to parasitic disease. *Exp Parasitol* 1996; 84: 300–303.
- 35 Le Hir M, Bluethmann H, Kosco-Vilbois MH *et al*. Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling. *J Exp Med* 1996; 183: 2367–2372.
- 36 Kun JFJ, Mordmüller B, Lell B, Lehman LG, Luckner D, Kremsner PG. Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet* 1998; 351: 265–266.
- 37 Burgner D, Xu W, Rockett K *et al*. Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. *Lancet* 1998; 352: 1193–1194.
- 38 Clark IA, Rockett KA, Cowden WB. Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *Lancet* 1992; 340: 894–896.
- 39 Chiwakata CB, Hemmer CJ, Dietrich M. High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun* 2000; 68: 394–399.
- 40 Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY *et al*. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med* 1996; 184: 557–567.

- 41 Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, Ezekowitz RAB. The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 29–35.
- 42 Turner MW. Mannose-binding lectin : the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996; 17: 532–540.
- 43 Luty AJF, Kun JF, Kremsner PG. Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 1998; 178: 1221–1224.
- 44 Bellamy R, Ruwende C, Mcadam KPWJ *et al*. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. *Q J Med* 1998; 91: 13–18.
- 45 Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, Ossari S *et al*. *Plasmodium falciparum*: sickle-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol* 1997; 87: 39–46.
- 46 Ntoumi F, Rogier C, Dieye A, Trape JF, Millet P, Mercereau-Puijalon O. Imbalanced distribution of *Plasmodium falciparum* MSP-1 genotypes related to sickle-cell trait. *Mol Med* 1997; 3: 581–592.
- 47 Mount DL, Nahlen BL, Patchen LC, Churchill FC. Adaptations of the Saker-Solomons test : simple, reliable colorimetric field assays for chloroquine and its metabolites in urine. *Bull WHO* 1989; 67: 295–300.
- 48 Saiki RK, Scharf S, Faloona F *et al*. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350–1354.
- 49 Neonato MG, Lu CY, Guilloud-Bataille M *et al*. Genetic polymorphism of the mannose-binding protein gene in children with sickle cell disease: identification of three new variant alleles and relationship to infections. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 679–686.

4-1-2. Facteurs génétiques et infection palustre asymptomatique

L'étude d'association entre les facteurs génétiques de l'hôte africain et l'infection palustre asymptomatique, a fait l'objet de la publication suivante :

Mombo LE, Ntoumi F, Bisseye C, Ossari S, Lu CY, Nagel RL, Krishnamoorthy R. Human genetic polymorphisms and asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese schoolchildren. Am J Trop Med Hyg 2003 Feb;68(2):186-190.

Cette étude apporte, en premier lieu, dans la population gabonaise, des données sur la fréquence allélique des différents variants génétiques reconnus comme facteurs de l'infection palustre. Nous observons notamment une présence prédominante du groupe sanguin O (55,1%) dans cette population, par rapport aux autres groupes sanguins. En outre, nous retrouvons l'allèle TNF- α -238A à une fréquence assez élevée, par rapport à celle des populations afro-américaines (9,6% vs. 2,1%).

En second lieu, plusieurs associations ont été retrouvées dans cette analyse (réalisée pour la première fois) entre les facteurs génétiques de l'hôte et l'infection palustre asymptomatique. Ainsi, les filles hétérozygotes pour le variant G6PD A-, présentent un taux d'infections palustres asymptomatiques plus faible que celui des filles homozygotes pour le variant non-déficient ($P = 0,03$). Par contre, chez les garçons, le variant G6PD A- à l'état d'hémizygotie, n'est pas associé à une baisse du taux d'infections asymptomatiques. Nous retrouvons une association entre la présence des antigènes O et une fréquence faible des infections asymptomatiques palustres ($P = 0,05$).

Enfin, l'allèle TNF- α -238A a été associé à une multiplicité élevée de l'infection asymptomatique, c'est-à-dire à la présence de génotypes parasitaires de nature diverse. Cette association de l'allèle TNF- α -238A avec un répertoire élargi de souches à *P. falciparum*, confirme l'induction éventuelle de titre élevé d'anti-corps anti-parasitaires, observée lors de notre précédente étude.

HUMAN GENETIC POLYMORPHISMS AND ASYMPTOMATIC *PLASMODIUM FALCIPARUM* MALARIA IN GABONESE SCHOOLCHILDREN

LANDRY-ERIK MOMBO, FRANCINE NTOUMI, CYRILLE BISSEYE, SIMON OSSARI, CHANG YONG LU,
RONALD L. NAGEL, AND RAJAGOPAL KRISHNAMOORTHY

Centre International de Recherches Médicales de Franceville, Franceville, Gabon; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 458, Hôpital Robert Debré, Paris, France; Division of Hematology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York

Abstract. Several studies have focused their attention on the relationship between host genetic factors and susceptibility/resistance to severe malaria. However, there is a paucity of information concerning the role of host genetic factors in asymptomatic malaria, a form of low-grade *Plasmodium falciparum* infection without clinical symptoms. We investigated in this study the potential relationship between the host (human) genetic polymorphisms (glucose-6-phosphate dehydrogenase [G6PD], mannose binding lectin [MBL], tumor necrosis factor α [TNF α]₋₃₀₈ and ₋₂₃₈, and nitric oxide synthase 2 [NOS2]₋₉₅₄) and the prevalence and profile of asymptomatic *P. falciparum* infection in 158 Gabonese schoolchildren. We found that G6PD A⁻ heterozygous females (18 of 74) have a low prevalence of asymptomatic malaria (38.9% versus 67.3%; $P = 0.03$, by chi-square test). Children heterozygous for TNF α ₋₂₃₈ (25 of 156) carry high number of diverse infecting parasite genotypes (2.5 versus 1.99; variance $F = 3.05$). No statistically significant association was found between MBL, TNF α ₋₃₀₈, or NOS2 polymorphisms and asymptomatic malaria. Upon combining our data on asymptomatic forms with those from the literature for others forms, we conclude that G6PD A⁻ heterozygous females are protected against all forms of *P. falciparum* malaria, and that the TNF α _{-238A} allele confers protection against clinical malaria.

INTRODUCTION

Infection with *Plasmodium falciparum* has a wide spectrum of manifestations that are roughly classified into three clinical groups: asymptomatic infection, mild malaria, and severe malaria. In malaria-endemic areas, a significant proportion of children harbor parasites without presenting signs of clinical malaria and are considered asymptomatic cases.¹ Variant-specific immunity is one of the key components to explain the low-grade infection during extended periods without clinical symptoms.² Two reports suggested that long-term asymptomatic malaria could lead to anemia and may aggravate the clinical course of sickle cell disease.^{3,4} Conversely, it has been demonstrated that the sickle cell trait (AS genotype) confers a high level of protection against severe malaria.⁵

Apart from the sickle cell trait, other red cell blood-related genetic factors, i.e., α - and β -thalassemia, as well as metabolic abnormalities such as glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, have also been shown to confer protection against malaria.⁵ Williams and others have observed that α -thalassemia favored frequent infections of non-*P. falciparum* malaria in childhood.⁶ The possibility arises that the multiple infection might provide cross-reacting immune protection towards *P. falciparum*. Approximately 400 million people living in tropical and sub-tropical areas have a G6PD deficiency. Many variants, including the common G6PD B (wild type), G6PD A (non-deficient type), and G6PD A⁻ (deficient type), are observed. In these populations, molecular basis of G6PD variants showed that both G6PD A and G6PD A⁻ differ from G6PD B by a variation at nucleotide 376 (A→G), while G6PD A⁻ had an additional mutation at nucleotide 202 (G→A).⁷ *In vitro* growth of *P. falciparum* has been shown to be delayed in G6PD-deficient red blood cells.⁸ Conversely, this parasite has been shown to be available to induce the synthesis of physiologic active G6PD that is found in the cytoplasm of red blood cells.⁹

Among the host genetic factors other than red blood

cell-related defects, genetic variants of mannose binding lectin (MBL), tumor necrosis factor α (TNF α), and inducible nitric oxide synthase 2 (NOS2) loci have been associated with resistance/susceptibility status to clinical malaria.^{10–15} Mannose binding lectin is a calcium-dependent protein secreted by hepatocytes. Variations in the circulating levels of MBL correspond to the presence of allelic variants (codons 52, 54, and 57) of this locus, and the presence of these alleles seem to favor recurrent bacterial and fungal infections, as well as the status of clinical malaria.^{10,16,17} Polymorphisms in the promoter region of the TNF α gene are associated with the TNF α production and with susceptibility to severe malaria.^{11–13,18,19} Nitric oxide synthase 2 is the critical enzyme involved in the synthesis of nitric oxide, a short-lived molecule with diverse functions including antimicrobial activity that can also cause damage to the host cell.²⁰ The role of nitric oxide in many parasite diseases, including malaria, has been studied, but the involvement of NOS2 gene polymorphisms in malaria remains unclear.^{14,15,20}

The aim of the present study was 1) to investigate the allelic prevalence of the G6PD, MBL, TNF α , and NOS2 loci in a population of schoolchildren from a malaria-endemic area (Dienga, Gabon) and 2) to explore in these children the potential relationship between these polymorphisms and the prevalence of asymptomatic *P. falciparum* infection and the parasite infection profile.

MATERIALS AND METHODS

Study area. This cross-sectional study was carried out in the village of Dienga (mixed savannah/forest area in southeastern Gabon) where *P. falciparum* is endemic. The entomologic inoculation rate was one infective bite per person per day, and *Anopheles funestus* was the most predominant vector.²¹ The two principal peaks of *P. falciparum* transmission occur between February and May and between October and December.²²

Study population. Two hundred seventy-one schoolchildren (154 males and 117 females, age range = 7–19 years) were recruited and followed for four months from February to May 1995. Of the 271 children, 113 had the symptoms of malaria infection and were excluded from the study. Thus, the DNA from 158 schoolchildren was available for studying the relationship between asymptomatic malaria and human genetic polymorphisms. Thick and thin blood smears were prepared to determine parasite densities. Only *P. falciparum* was analyzed in this study. The parasitemia threshold of 800 parasites/ μ L in our region has previously been determined to be the threshold below which almost all children are symptom-free (Ntoumi F and others, unpublished data). All 158 children recruited had no parasites or a parasite density \leq 800 parasites/ μ L of blood, and had no symptoms in either the two weeks prior to or the days following blood collection. Informed consent was obtained from the parents or guardians of children before sampling. Whole blood was centrifuged, and the serum and red blood cells were separated and cryopreserved until analyzed. This study was approved by the Institutional Ethical Committee of the International Center for Medical Research of Franceville (Franceville, Gabon).

DNA polymorphism analysis. To detect the genetic polymorphisms of the G6PD, MBL, TNF α , and NOS2 loci, amplification of the relevant DNA segments by a polymerase chain reaction (PCR), followed by restriction fragment length polymorphism analysis, were carried out as previously described (Table 1).

Merozoite surface antigen-2 (MSA-2) genotyping. To determine the parasite infection profile, *P. falciparum* genotyping was performed using a nested PCR for the MSA-2 gene locus, which encodes a merozoite surface glycoprotein.²³ This locus consists of two conserved regions and one central variable length region. Size variations in the central block could be identified using primers derived from the highly conserved regions in the PCR, followed by analysis of the PCR products by agarose gel electrophoresis.

Statistical analysis. The chi-square test was used to compare the distribution of different host genetic variants in subsets of individuals with and without parasites. Analysis of variance was performed to compare the mean number of distinct parasite alleles per infected isolate in the subset of patients harboring parasites. Statistical significance was defined as $P < 0.05$.

RESULTS

Host genetic variants in schoolchildren from the malaria-endemic area. Allele frequencies of G6PD, MBL, TNF α , and NOS2 genetic variants in the studied population are shown in Table 2. Distribution of the alleles at each locus followed Hardy-Weinberg expectations. For the X-linked G6PD locus, in females, the different G6PD genotypes encountered were BB (27.3%), AB (31.6%), AA (8.6%), A⁻B (15.4%), A⁻A (15.4%), and A⁻A⁻ (1.7%), while in males, the genotypes were B (51.9%), A (33.8%), and A⁻ (14.3%). With regard to mutant alleles in the MBL locus, a mutation in codon 57 (18.7%) was predominant compared with one in codon 54 (2.5%) and in intron IVS1-5 (3.1%). Three different variant alleles of the TNF α promoter region were found and their frequencies are given in Table 2. The TNF α _{-244A} allele was found only in a very low proportion (1.3%). The only variant allele for the NOS2 locus genotyped in this study population, NOS2_{-954C}, was found at a frequency of 0.098.

Host genetic polymorphisms and prevalence of asymptomatic malaria. Isolates were tested for the presence of *P. falciparum* by nested PCR amplifications of the polymorphic locus MSA-2. Among the 158 symptom-free children with parasite densities ranging from 0 to 800 parasites/ μ L, 60 were parasite-free and 98 were positive for *P. falciparum* in the PCR. The relationship between the presence of host genetic variants and prevalence of infection were examined (Table 3). Of 158 children, one, who was homozygous for G6PD A⁻A⁻, was identified and found to be parasite free. A significantly low proportion of G6PD A⁻ heterozygous females harbored asymptomatic *P. falciparum* infections (38.9% versus 67.3%; $P = 0.03$, by chi-square test). The percentage of G6PD A⁻ hemizygous males harboring parasites was not different from those bearing the wild type G6PD allele. No significant difference in the prevalence of asymptomatic malaria was found between children bearing mutant MBL genotypes and those homozygous for the wild type. Similarly, the distribution of TNF α _{-308A}, TNF α _{-238A}, and NOS2_{-954C} variant alleles did not show any association with the prevalence of asymptomatic malaria. The ABO blood group analysis in all children revealed that O antigen (55.1%) was the most predominant, followed by A (24.7%), B (19.6%) and AB (0.6%) antigens. Only a weak association between the presence of blood group O antigen and prevalence of asymptomatic malaria was found

TABLE 1
Human DNA polymorphisms subjected to genotyping analysis*

Base substitution	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Length (basepairs)	Restriction endonuclease	Reference
G6PD 202G → A	G6PD-1: 5'-TTACAGCTGTGCCCTGCCCT-3' G6PD-2: 5'-AGGGCAACGGCAAGCCTTAC-3'	60	919	<i>Nla</i> III (+)	7
G6PD 376A → G	G6PD-2 and G6PD-3: 5'-CTGCGTTTTCTCCGCCAATC-3'	60	585	<i>Fok</i> I (+)	7
MBL 54G → A	MBP-2: 5'-CAGGCAGTTTCTCTCGGAAGG-3' MBP-3: 5'-GCACCCAGATTGTAGGACAGAG-3'	57	340	<i>Ban</i> I (-)	34
MBL 57G → A	MBP-2 and MBP-3	57	340	<i>Mbo</i> II (+)	34
MBL IVS-1-5G → A	MBP-2 and MBP-3	57	340	<i>Nla</i> III (+)	34
TNF α -308G → A	TNF α 1: 5'-GGCAATAGGTTTTGAGGGCCATG-3' TNF α 2: 5'-CACACTCCCCATCCTCCCTGATC-3'	58	117	<i>Nco</i> I (-)	35
TNF α -244G → A	TNF α 1 TNF α 2	58	117	<i>Dde</i> I (+)	30
TNF α -238G → A	TNF α 1 and TNF α 2	58	117	<i>Alw</i> I (-)	36
NOS2-954G → C	NOS2-1: 5'-TGTTGGGACGGTGAGATCAAGGT-3' NOS2-2: 5'-CTCATCAAAGGTGGCCGAGAGAT-3'	60	1273	<i>Bsa</i> I (-)	15

* G6PD = glucose-6-phosphate dehydrogenase; MBL = mannose binding lectin; TNF α = tumor necrosis factor α ; NOS2 = nitric oxide synthase 2. A base substitution creates (+) or abolishes (-) a specific restriction endonuclease site; the underlined nucleotides indicate a mismatch.

TABLE 2
Allelic frequencies of G6PD, MBL, TNF α , and NOS2 loci in school-children from the village of Dienga, Gabon*

Host genetic variants	Allelic frequency	Number of samples†
G6PD B	0.515	271
G6PD A	0.330	271
G6PD A ⁻	0.155	271
MBL 57 GGA → GAA	0.187	214
MBL 54 GGC → GAC	0.025	214
MBL IVS-1-5 G → A	0.031	214
TNF α -308 G → A	0.120	264
TNF α -244 G → A	0.013	264
TNF α -238 G → A	0.096	264
NOS2-954 G → C	0.098	118

* For definitions of abbreviations, see Table 1.

† Amplification of each allele could not be obtained for all DNA samples.

(44.8% with O antigen versus 29.6% with non-O antigens; $P = 0.05$, by chi-square test).

Host genetic polymorphisms and multiplicity of asymptomatic malaria. The multiplicity of infection, defined as the mean number of individual parasite genotypes per infected sample, was 2.14 in these isolates. No significant relationship between multiplicity of infection and G6PD genotypes was observed in females (wild type = 1.92 versus heterozygous = 2.43) or in males (wild type = 2.13 versus heterozygous = 2.22). The profile of multiplicity of infection was similar between children heterozygous for an MBL genotype (1.93) and those homozygous for the wild type (2.2). Multiplicity of infection was higher in children heterozygous for TNF α -238A than in those homozygous for TNF α -238G -wild type- (2.5 versus 1.99, respectively; $F = 3.05$, by analysis of variance). For the TNF α -308A allele, no significant difference in multiplicity of infection was observed (heterozygous = 2.12 versus wild

TABLE 3
Distribution of host genetic variants in groups of schoolchildren aparasitemic and asymptomatic for *Plasmodium falciparum**

Host polymorphisms	Uninfected	Asymptomatic	Malaria prevalence (%)	P (by chi-square test)
G6PD A ⁻ heterozygous female	11	7	38.9	0.03
G6PD wild type female	18	37	67.3	–
G6PD A ⁻ hemizygous male	3	9	75	0.6†
G6PD wild type male	27	45	62.5	–
MBL heterozygous for 57 or 54	17	30	63.8	0.7
MBL wild type	39	61	61	–
TNF α -308A/G (heterozygous state)	7	17	70.8	0.33
TNF α -308G/G (wild type)	50	76	60.3	–
TNF α -238A/G (heterozygous state)	7	18	72	0.27
TNF α -238G/G (wild type)	52	79	60.3	–
NOS2-954C/G (heterozygous state)	5	12	70.6	0.32
NOS2-954G/G (wild type)	3	45	57.7	–

* For definitions of abbreviations, see Table 1.

† By Yates' test.

type homozygous = 2.05). No significant difference in multiplicity of infection was found between children heterozygous for NOS2-954C (2.25) and those with wild type alleles (1.98). No association was found between ABO blood group antigens and the incidence of multiplicity of infection.

TNF α polymorphisms and asymptomatic malaria related to the sickle cell trait. Concerning children with or without the sickle-cell trait, no statistically significant difference in the prevalence of asymptomatic malaria was found in children with various TNF α genotypes (Table 4).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to analyze the relationship between human genetic factors and asymptomatic *P. falciparum* infection. We studied the genetic profiles of G6PD, MBL, TNF α , and NOS2 loci in schoolchildren residing in a region endemic for malaria (Dienga in southeastern Gabon).

The frequency of various G6PD alleles found in this study is comparable to that observed in another Gabonese group.²⁴ Our findings show that G6PD A⁻ heterozygous females are much more resistant to asymptomatic malaria than females homozygous for the wild type alleles. Interestingly, G6PD A⁻ hemizygous males are not protected against this form of malaria. A study conducted in Nigeria among a population of children with severe malaria indicated a protective effect of the G6PD A⁻ allele in heterozygous females and in males hemizygous for the wild type allele.²⁵ However, in the Gambia, protection against severe malaria was observed both in females heterozygous for the G6PD A⁻ allele and in males hemizygous for this allele, albeit at different rates (46% for heterozygous females and 58% for hemizygous males).²⁶ In addition, resistance against the mild form of malaria was observed only in females heterozygous for G6PD A⁻. Based on these data, including the data from this study, the G6PD A⁻ heterozygous state in females confers protection against all forms of malaria, including the asymptomatic form.

TABLE 4
Tumor necrosis factor α (TNF α) polymorphisms according to sickle cell trait carriage in uninfected and asymptomatic groups of schoolchildren

Host genetic factors	Uninfected	Asymptomatic	Malaria prevalence (%)	P^*
AA carriers				
TNF α -308A/G (heterozygous)	5	14	73.7	0.55
TNF α -308G/G (wild type)	31	62	66.7	–
TNF α -238A/G (heterozygous)	5	17	77.3	0.35
TNF α -238G/G (wild type)	31	63	67	–
AS carriers				
TNF α -308A/G (heterozygous)	2	3	60	–
TNF α -308G/G (wild type)	19	14	42.4	–
TNF α -238A/G (heterozygous)	2	1	33.3	–
TNF α -238G/G (wild type)	21	16	43.2	–

* By chi-square test.

The mechanism of this protection may involve a previously proposed hypothesis: the parasite in G6PD A⁻ heterozygous female host must cycle between G6PD A⁻ and G6PD wild type erythrocytes and may fail to adapt to the G6PD A⁻ environment.^{5,9,27} The multiplicity of infection in asymptomatic malaria is in general higher in G6PD A⁻ heterozygous females than in females with wild type alleles. This could be the consequence of difficulties of parasite adaptation to the cellular environment. Conversely, oxidative stress has been considered a critical determinant in conferring resistance in G6PD A⁻ hemizygous males.²⁸ Without such stress, the parasites appeared to adapt and normalize their growth after four to five cycles in G6PD-deficient cells.²⁷ This is likely due to the induction of parasite-encoded G6PD.⁹ Our observation that the mean number of infecting genotypes in G6PD A⁻ hemizygous males and in males with the wild type G6PD allele is similar seems to support this interpretation.

The MBL-deficient status characterized by MBL variant alleles was not associated with asymptomatic *P. falciparum* infection (prevalence and multiplicity) in our study. A study among Gambian children has shown absence of an association between MBL deficiency and clinical malaria,²⁹ although another study found a weak association between MBL deficiency and severe malaria in young Gabonese children.¹⁰ This discrepancy could be due to differences in malarial forms studied and the age group of the children. Together with other components of the innate immune system, MBL contributes to efficient antimicrobial immunity and protection, particularly during the physiologic window of vulnerability following the decay of maternal antibody.¹⁶ The MBL deficiency may be not associated with malaria, but it may be a risk factor for severe malaria in children who lack well-developed protective acquired immune responses.¹⁰

Tumor necrosis factor α is a potent immunomodulator and proinflammatory cytokine that has been implicated as a pathogenic mediator in many inflammatory infections and immune diseases. Among the three polymorphisms studied, only the TNF α_{-238A} allele had a higher frequency in Sub-Saharan Africans (9.6%) than in African Americans (2.1%),³⁰ and the reasons for such difference are not clear and cannot be explained by the Caucasian admixture of the African Americans. In fact, in Caucasians such as British whites, the TNF α_{-238A} allele frequency was found to be 6%.³¹

We found in our study population that the TNF α_{-238A} allele in the heterozygous state was associated with a higher diversity of the infecting genotypes, but not with prevalence of asymptomatic malaria. The high multiplicity of infection in individuals heterozygous for TNF α_{-238A} implies the presence of multiple parasite strains that may accelerate the acquisition of protective immunity in these individuals, due to exposure to a larger repertoire of *P. falciparum* strains. Thus, the high frequency of mixed-genotype infections in asymptomatic children may play a role in protection against clinical malaria.³² This was confirmed in a study of logistic regression analysis of three TNF α polymorphisms, which indicated that the TNF α_{-238A} allele was associated with a decreased susceptibility to cerebral malaria.¹⁵

Although children heterozygous for TNF α_{-238A} carry multiple parasite strains, they show a prolonging of asymptomatic malaria. Asymptomatic *P. falciparum* infection is associated with significant anemia.³ In fact, low-level malaria parasitemia can cause anemia by impairment of red blood cell pro-

duction and/or enhancement of red blood cell destruction.¹ In another study in a Gambian population, severe malarial anemia was associated with the TNF α_{-238A} allele.¹² The TNF α_{-238A} allele may also confer protection against clinical malaria by favoring low-grade infection, but it can gradually lead to malarial anemia.

We found no association between TNF α_{-308A} polymorphism and asymptomatic *P. falciparum* malaria in terms of both prevalence and multiplicity of infections. One study on complicated malarial infections showed that the homozygous state for the TNF α_{-308A} allele was associated with death or severe neurologic sequelae due to cerebral malaria in Gambian children.¹¹ Another study showed that the heterozygous state for this allele was associated with a risk of severe infectious disease of either malarial or other origin in Sri Lankan adults.¹⁹

The high prevalence of asymptomatic malaria observed in children with blood group O antigen, when compared with those without this antigen, suggests a protective effect of the O antigen against clinical forms of malaria. However, other explanations, such as the anti-rosette formation effect associated with blood group antigens, should also be considered.³³

In conclusion, we have shown that G6PD A⁻ heterozygous females were resistant to asymptomatic malaria and that subjects heterozygous for the TNF α_{-238A} allele carried a high number of infecting genotypes in asymptomatic malaria. These two genotypes likely play different roles in clinical *P. falciparum* infection.

Received March 7, 2002. Accepted for publication May 28, 2002.

Acknowledgments: We thank L. Sica, P. Millet, F. Lekoulou, P. Tshipamba, R. Nabias, A. Luty, H. Tiga, D. Lewobo, and J. Lansoud-Soukate for field assistance. We are indebted to the villagers, especially the children, for their participation in this study.

Financial support: This study was funded by the Centre International de Recherches Médicales (CIRMF-Gabon), which is supported by the Government of Gabon, ELF-Gabon, and the Ministère Français des Affaires Étrangères.

Disclaimer: The opinions or assertions contained in this manuscript are the private ones of the authors and are not to be construed as the official or reflecting views of the Department of Defense or the United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases.

Authors' addresses: Landry-Erik Mombo and Rajagopal Krishnamoorthy, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 458, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris, France. Francine Ntoumi, Cyrille Bisseye, Simon Ossari, and Chang Yong Lu, Centre International de Recherches Médicales de Franceville, BP 769, Franceville, Gabon. Ronald L. Nagel, Division of Hematology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, New York 10461.

Reprint requests: Landry-Erik Mombo, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 458, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019 Paris, France, Telephone: 33-1-40-03-19-01, Fax: 33-1-40-03-19-03, E-mail: lemombo@yahoo.com

REFERENCES

- Greenwood BM, 1987. Asymptomatic malaria infections: do they matter? *Parasitol Today* 3: 206-214.
- Staalsoe T, Hviid L, 1998. The role of variant-specific immunity in asymptomatic malaria infections: maintaining a fine balance. *Parasitol Today* 14: 177-178.
- Kurtzhals JAL, Addae MM, Akanmori BD, Dunyo S, Koram KA, Appawu MA, Nkrumah FK, Hviid L, 1999. Anaemia

- caused by asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune African schoolchildren. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 623-627.
4. Gendrel D, Kombila M, Nardou M, Gendrel C, Djouba F, Martz M, Richard-Lenoble D, 1992. Malaria and haemoglobin S : interactions in African children. *Presse Med* 21: 887-890.
 5. Nagel RL, Roth EF, 1989. Malaria and red cell defects. *Blood* 74: 1213-1221.
 6. Williams TN, Maitland K, Bennett S, Ganczakowski M, Peto TE, Newbold CI, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB, 1996. High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children. *Nature* 383: 522-525.
 7. Hirono A, Beutler E, 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3951-3954.
 8. Roth EF, Raventos-Suarez C, Rinaldi A, Nagel RL, 1983. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 298-299.
 9. Usanga EA, Luzzatto L, 1985. Adaptation of *Plasmodium falciparum* to glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient host red cells by production of parasite-encoded enzyme. *Nature* 313: 793-795.
 10. Luty AJF, Kun JFJ, Kremsner PG, 1998. Mannose-binding lectin plasma levels and gene polymorphisms in *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis* 178: 1221-1224.
 11. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D, 1994. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 371: 508-511.
 12. McGuire W, Knight JC, Hill AVS, Allsopp CEM, Greenwood BM, Kwiatkowski D, 1999. Severe malarial anaemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis* 179: 287-290.
 13. Knight JC, Udalova I, Hill AVS, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D, 1999. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 22: 145-150.
 14. Burgner D, Xu W, Rockett K, Gravenor M, Charles IG, Hill AVS, Kwiatkowski D, 1998. Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. *Lancet* 352: 1193-1194.
 15. Kun JFJ, Mordmuller B, Lell B, Lehman LG, Luckner D, Kremsner PG, 1998. Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet* 351: 265-266.
 16. Turner MW, 1996. Mannose binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 11: 532-540.
 17. Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW, 1989. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet* i: 1236-1239.
 18. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW, 1997. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3195-3199.
 19. Wattavidanage J, Carter R, Perera KLRL, Munasingha A, Bandara S, McGuinness D, Wickramasinghe AR, Alles HK, Mendis KN, Premawansa S, 1999. TNF α 2 marks high risk of severe disease during *Plasmodium falciparum* malaria and other infections in Sri Lankans. *Clin Exp Immunol* 115: 350-355.
 20. Burgner D, Rockett K, Kwiatkowski D, 1999. Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child* 81: 185-188.
 21. Elissa N, Karch S, Bureau P, Ollomo B, Lawoko M, Yangari P, Ebang B, Georges AJ, 1999. Malaria transmission in a region of savannah-forest mosaic, Haut-ogoué, Gabon. *J Am Mosq Control Assoc* 15: 15-23.
 22. Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, Ossari S, Luty A, Reltien J, Georges A, Millet P, 1997. *Plasmodium falciparum*: Sickle-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol* 87: 39-46.
 23. Ntoumi F, Contamin H, Rogier C, Bonnefoy S, Trape JF, Mercereau-Puijalon O, 1995. Age dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg* 52: 81-88.
 24. Lell B, May J, Schmidt-Ott RJ, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herbich K, Mockenhaupt FP, Meyer CG, Kremsner PG, 1999. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin Infect Dis* 28: 794-799.
 25. Bienzle U, Ayeni O, Lucas AO, Luzzatto L, 1972. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and malaria. Greater resistance of female heterozygous for enzyme deficiency and males with non-deficient variant. *Lancet* i: 107-110.
 26. Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SNR, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CEM, Gilbert SC, Peschu N, Newbold CI, Greenwood BM, Marsh K, Hill AVS, 1995. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 376: 246-249.
 27. Luzzatto L, Sodeinde O, Martini G, 1983. Genetic variation in the host and adaptive phenomena in *Plasmodium falciparum* infection, in malaria and the red cell. *Ciba Found Symp* 94: 159-173.
 28. Janney SK, Joist JJ, Fitch CD, 1986. Excess release of ferriheme in G6PD-deficient erythrocytes: possible cause of haemolysis and resistance to malaria. *Blood* 67: 331-333.
 29. Bellamy R, Ruwende C, McAdam KPWJ, Thursz M, Sumiya M, Summerfield J, Gilbert SC, Corrah T, Kwiatkowski D, Whittle HC, Hill AVS, 1998. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. *Q J Med* 91: 13-18.
 30. Zimmerman PA, Guderian RH, Nutman TB, 1996. A new TNFA promoter allele identified in South American Blacks. *Immunogenetics* 44: 485-486.
 31. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP, 2000. Cytokine (TNF α , LT α and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 1: 185-190.
 32. Engelbrecht F, Felger I, Genton B, Alpers M, Beck HP, 1995. *Plasmodium falciparum*: malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Exp Parasitol* 81: 90-96.
 33. Barragan A, Kremsner PG, Wahlgren M, Carlson J, 2000. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect Immun* 68: 2971-2975.
 34. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW, 1992. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1: 709-715.
 35. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW, 1992. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by Nco I restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1: 353.
 36. D'Alfonso S, Richiardi PM, 1994. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics* 39: 150-154.

4-2. GLYCOPROTÉINES CD1 ET INFECTIONS PALUSTRES

Compte tenu de la particularité des glycoprotéines CD1 à présenter des antigènes glycolipidiques, nous nous sommes intéressés aux variants génétiques de ces molécules et à leur éventuelle influence dans les populations africaines, exposées à une énorme pression des maladies infectieuses.

4-2-1. Allèles de CD1E

Les résultats de l'exploration du gène CD1 le plus polymorphe (CD1E), ont été l'objet de la publication suivante :

Tamouza R, Sghiri R, Ramasawmy R, Neonato MG, **Mombo LE**, Poirier JC, Schaeffer V, Fortier C, Labie D, Girot R, Toubert A, Krishnamoorthy R, Charron D. Two novel CD1 E alleles identified in black African individuals. *Tissue Antigens* 2002 May;59(5):417-420.

Cette étude, effectuée dans le but de rechercher de nouveaux variants génétiques des gènes CD1, a permis de découvrir 2 nouveaux allèles (CD1E*05 et CD1E*06) du gène CD1E. Ainsi, elle a montré que le gène CD1E était plus polymorphe que précédemment observé, avec 6 allèles découverts.

Nous avons, dans cette étude, mis en place la technique de RFLP-SDM pour détecter les 2 nouveaux allèles du gène CD1E.

Outre, les séquences des 2 nouveaux allèles (CD1E*05 et CD1E*06) déposées pour être répertoriées à l'Institution GenBank, nous avons proposé l'adoption d'une nomenclature internationale des allèles CD1E, à l'image de celle utilisée pour les allèles HLA.

R. Tamouza
 R. Sghiri
 R. Ramasawmy
 M.G. Neonato
 L.E. Mombo
 J.C. Poirier
 V. Schaeffer
 C. Fortier
 D. Labie
 R. Girot
 A. Toubert
 R. Krishnamoorthy
 D. Charron

Two novel CD1 E alleles identified in black African individuals

Key words:

African individuals, alleles: CD1E gene; polymorphism

Acknowledgments

This work was supported by ARS 2.03 (IGH 2000) grants and EUROAS BMH-CT 98-3605 contract. We thank the editorial advice and Dr Steven G. E. Marsh for helpful suggestions.

Abstract: CD1 gene (CD1A to CD1E) products are involved in non-peptide antigen presentation, such as lipids and glycolipids, to T cells. With a similar function to MHC, namely antigen presentation, these genes nevertheless displayed a much lower level of polymorphism as compared to MHC. We report here two additional CD1E variants identified in black African individuals, designated herein CD1E*05 and CD1E*06. While the former differs from the common (wild type) allele sequence by two substitutions at nucleotide positions 217 and 229 of exon 2, the latter only by a single base change at position 91 of exon 3. These substitutions lead to amino acid changes at position 73 and 77 of the $\alpha 1$ domain in the former and at position 30 of the $\alpha 2$ domain in the latter. Identification of these additional variants suggests that the CD1 locus, especially the CD1E gene, is much more polymorphic than previously assumed¹.

Among the MHC class I-like genes, CD1 cluster is a group of five closely related genes, termed CD1A, B, C, D and E (1, 2). Very likely derived from a common MHC/CD1 ancestor gene, they presently constitute an additional antigen presentation pathway, specialized in the presentation of lipid and lipoglycan antigens to T cells (3). Based on the sequence homology and functional specialization of their products, these genes are divided into two groups: group 1 consists of CD1A, B, C and E genes and group 2 CD1D (4). In earlier studies, CD1 genes were believed to be non-polymorphic, but recent reports have shown that they display some level of diversity especially the CD1E gene (5–7). Indeed, four CD1E alleles have been

Authors' affiliations:

R. Tamouza¹,
 R. Sghiri¹,
 R. Ramasawmy²,
 M.G. Neonato²,
 L.E. Mombo^{3,4},
 J.C. Poirier¹,
 V. Schaeffer¹,
 C. Fortier¹,
 D. Labie⁵,
 R. Girot²,
 A. Toubert¹,
 R. Krishnamoorthy²,
 D. Charron⁶

¹Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité AP-HP, IGH and INSERM U396, Hôpital Saint-Louis, Paris, France.

²Laboratoire d'Hématologie et FANBA de Biologie Moléculaire, Hôpital Tenon, Paris, France.

³INSERM U458, Hôpital Robert Debré, Paris, France.

⁴Center International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Gabon.

⁵EGM Hôpital Cochin, Paris, France

Correspondence to:

Dr Ryad Tamouza
 Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité, Hôpital Saint Louis, 1, avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France
 Tel: 33 1 42 49 49 90
 Fax: 33 1 42 49 46 41
 e-mail: tamouza@histo.chu-stlouis.fr

¹The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the GenBank nucleotide sequence database and has been assigned the accession numbers AF364031, AF364032, AF364033 and AF364034.

²In agreement with S. G. E. Marsh, an initiative is launched to coordinate the nomenclature and update the sequence alignment of the alleles of the CD1 locus. Those interested, please contact Dr R. Tamouza at: Fax: 33 1 42 49 46 41 and e-mail: tamouza@histo.chu-stlouis.fr

PCR primer combination for the study of exon 2 and 3 polymorphism of CD1E

PCR	Primer pairs	PCR length in base pairs	Specificity
A	CD1Eα25*-CD1Eα23*	310	CD1E exon 2
B	CD1Eα55*-CD1Eα33*	297	CD1E exon 3
B'	CD1Eα28*-RREα2M**	200	CD1E exon 2

*Primer previously described (7)
**Exon 2 reverse primer with a deliberately introduced underlined 3' mismatch to create a Rsa I restriction site at position 217 (5'-GCACATCCGGATAAAAGT*3').

Table 1

characterized so far, alleles 1, 2, 9 L and 15 L, resulting in amino acid changes in exon 2 and exon 3 (6, 7). Here, we report two additional CD1E variant alleles, termed CD1E*05 and CD1E*06, found by chance in unrelated black African individuals during the course of establishing the technology for CD1 analysis in our laboratory. CD1E exon 2 and 3 polymorphisms were identified by direct sequencing of the PCR products using primers already described by Mirones et al. (7). Amplified products of 310 and 297 bp were purified and sequenced directly using dye-terminator chemistry (ABI/Perkin Elmer, Foster City, USA) with a redundancy of six to 10-fold. To confirm the observed nucleotide changes, the amplified products were also cloned into a plasmid (pCRTMII - TA cloning Kit InVivoGen, Leek, the Netherlands) and sequenced using Taq-FS fluorescent dye-primer kit (ABI/Perkin Elmer, Foster City, USA). Nucleotide sequence of the clones confirmed the direct sequencing findings: for CD1E*05, the sequence was almost identical to that of previously reported allele 2, excepting at position 217 of exon 2 where an A→G change was noted. For CD1E*06, the sequence was similar to that of allele 1 except for a G→A substitution at nucleotide position 91 of the exon 3 (Fig. 1a). These substitutions lead to the following sense changes in the antigen, respectively, Histidine to Arginine at codon 73 of the α1 heavy chain domain and from Serine to Asparagine at codon 30 of the α2 heavy chain domain (Fig. 1b). For further population screening, we have also set up a simple PCR-RFLP strategy for detection of these novel alleles (Tables 1 and 2) with one of the primers having a deliberately introduced mismatch to create a Rsa I restriction site. This rapid screening method allowed us to show that these new alleles are not present among 150 unrelated French Caucasian subjects tested, suggesting that these variants may be ethnically restricted. Further large studies would be necessary to confirm this finding.

The variants reported herein (CD1E*05 and CD1E*06) are likely to have arisen by point substitutions on a preexisting sequence background, namely allele 2 and allele 1, respectively. While it is believed that gene conversion is the major force generating the HLA diversity, with the available information, the CD1 locus seems to

Strategy for PCR-RFLP-based allele assignment

(a) Exon 2 fragment sizes (in base pairs)				
Alleles	CD1E*01 CD1E*02 CD1E*04	CD1E*03 CD1E*05	CD1E*06	CD1E*08
Enzymes				
Hpa II	310	-	-	-
	-	249	249	-
	-	61	61	-
Rsa I	260	200	-	-
	-	-	239	-
	-	-	21	-
(b) Exon 3 fragment sizes (in base pairs)				
Alleles	CD1E*01 CD1E*02 CD1E*05	CD1E*03	CD1E*04	CD1E*06
Enzymes				
Mae I	173	173	173	173
	-	-	124	-
	70	70	-	70
	54	54	-	54
Hpa II	-	297	-	-
	161	-	161	161
	136	-	136	136
Dde I	-	-	-	297
	208	208	208	-
	89	89	89	-

Table 2

evolve essentially through point mutations. This might partly explain the relatively low degree of diversity of CD1 locus as compared to HLA locus.

Presently, six CD1E variants are known. However, for some alleles (6, 7), while exonic regions spanning the polymorphic positions in exon 2 and 3 were analyzed at the nucleotide level, other exons were analyzed only by an indirect single strand conformational polymorphism analysis (Table 3). Hence, a detailed molecular characterization of the CD1 alleles (at least for the α1 and α2 heavy chain coding regions), quite similar to the description of HLA alleles, need to be carried out. For standardizing the nomenclature of alleles, a chronological numbering using the HLA WHO nomenclature guidelines (8, 9) seems convenient as proposed in Table 2.

Essentially detected in ER and in late CD63⁺ endosomal compartments, CD1E seems involved in the maturation program of dendritic cells, which implies a role in the expression and traffic

Acquired structural data and proposal for allele designation

Allele designation		DNA explored	
Previous	Present proposal	For exon 2	For exon 3
Allele 1	CD1E*01	Sequencing	Sequencing
Allele 2	CD1E*02	Sequencing	SSCP + Sequencing*
9L	CD1E*03	SSCP	Sequencing
15L	CD1E*04	SSCP	Sequencing
CD1E*05	CD1E*05	Sequencing*	Sequencing*
CD1E*06	CD1E*06	Sequencing*	Sequencing*

*In the present study

Table 3

through endosomal pathway of antigen-presenting molecules such as CD1 group I as well as HLA-DR (10). The two changes

reported here are located in the F pocket which seems to be more critical than the A pocket as shown in the crystallographic structure of the CD1D molecule (11). These changes indeed introduce electrophilic and charged amino acid side chains in an otherwise neutral and hydrophobic antigen binding groove. Such sequence diversity within the antigen binding groove may either affect the repertoire of presented non-peptide antigens, if ever CD1E is involved in such activity or modify the trafficking of CD1 molecules.

The herein described novel alleles seem to be private for African individuals (not found among Caucasians) and raises the interesting possibility of their maintenance by a pathogen-driven selection. Studies of CD1 polymorphism in various ethnic groups may contribute to determine whether CD1-restricted T cell responses to non-peptide antigens are significantly involved in protective immune responses to population/ecology-specific microbial pathogens.

References

- Calabi F, Milstein C. A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6. *Nature* 1986; 323: 540-3.
- Yu CY, Milstein C. A physical map linking the five CD1 human thymocyte differentiation antigen genes. *EMBO J* 1989; 8: 3527-32.
- Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 297-329.
- Calabi F, Jarvis JM, Martin L, Milstein C. Two classes of CD1 genes. *Eur J Immunol* 1989; 19: 285-92.
- Han M, Hannick LI, DiBriano M, Robinson MA. Polymorphism of human CD1 genes. *Tissue Antigens* 1999; 54: 122-7.
- Oteo M, Parra JF, Mirones I, Gimenez LI, Setien F, Martinez-Naves E. Single strand conformational polymorphism analysis of human CD1 genes in different ethnic groups. *Tissue Antigens* 1999; 53: 545-50.
- Mirones I, Oteo M, Parra-Cuadrado JF, Martinez-Naves E. Identification of two novel human CD1E alleles. *Tissue Antigens* 2000; 56: 159-61.
- Marsh SG, Bodmer JG, Albert ED et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Tissue Antigens* 2001; 57: 236-83.
- <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>
- Angenieux C, Salamero J, Fricker D et al. Characterization of CD1e, a third type of CD1 molecule expressed in dendritic cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 37757-64.
- Zeng Z, Castano AR, Segelke BW, Saura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 1997; 277: 339-45.

4-2-2. Allèles CD1 dans les populations gabonaise et française

Après avoir caractérisé deux nouveaux allèles CD1E, nous avons déterminé le profil des allèles CD1E et CD1A dans deux populations distinctes :

- une population africaine sub-saharienne provenant du Gabon
- une population caucasienne française

Les fréquences alléliques de ces deux populations sont notées dans le tableau 3 :

Populations	CD1E allèles				CD1A allèles	
	E*01	E*02	E*05	E*06	A*01	A*02
Gabon (n = 145)	6,2%	87,2%	6,2%	0,4%	91%	9%
France (n = 181)	64%	36%	0%	0%	92%	8%

Tableau 3: Fréquences des allèles de CD1E et CD1A dans 2 populations gabonaise et française

4-2-3. Allèles CD1 et infections palustres

Les résultats de l'étude d'association entre les variants génétiques des molécules CD1 (A et E) et l'infection palustre asymptomatique d'une part, et entre ces mêmes variants et les accès simples palustres d'autre part, ont fait l'objet de la publication suivante :

Mombo LE, Ramasawmy R, Ossari S, Charron D, Krishnamoorthy R, Tamouza R. CD1 gene polymorphism is associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese schoolchildren. (Soumis à Journal of Infectious Diseases).

Cette étude traite d'un facteur génétique (molécules CD1) jamais analysé dans sa relation avec l'infection palustre.

Concernant l'infection palustre asymptomatique, aucune association n'a été retrouvée entre la fréquence de celle-ci et les variants génétiques des molécules CD1A et CD1E. Néanmoins, les sujets homozygotes pour l'allèle CD1E*02 tendent à présenter une diversité plus grande de génotypes parasitaires, par rapport aux individus hétérozygotes.

Le résultat primordial de cette étude, est l'association entre l'allèle CD1E*02 à l'état homozygote et une fréquence faible d'accès simples palustres ($P = 0,015$). En outre, nous avons observé que les sujets homozygotes pour l'allèle CD1E*02, comptaient peu d'individus ayant subi plusieurs accès simples de paludisme (résistance contre les re-infections). Cet allèle CD1E*02 traduit une protéine CD1E (ayant un acide aminé arginine en position 79, Q79R) qui pourrait présenter un site éventuel de contact pour les cellules T, et ainsi promouvoir une réponse immune anti-GPI lors de l'infection palustre.

CD1 gene polymorphism is associated with protection against *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese schoolchildren.

Landry-Erik MOMBO^{1, 2}, Rajendranath RAMASAWMY³, Simon OSSARI¹, Dominique CHARRON³, Rajagopal KRISHNAMOORTHY² and Ryad TAMOUZA³.

1. Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), BP 769, Franceville, Gabon.
2. INSERM U458, Hôpital Robert Debré, 48 Bd Sérurier, 75019 Paris, France.
3. Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité AP-HP, IUH and INSERM U396, Hôpital Saint-Louis, Paris, France.

Correspondence to: Landry-Erik MOMBO
INSERM U458
Hôpital Robert Debré
48, Bd Sérurier
75019 Paris, France
Phone: +33 1 40 03 19 01
Fax: +33 1 40 03 19 03
E-mail: lemombo@yahoo.com

Introduction. *Plasmodium falciparum* malaria remains one of the major causes of morbidity and mortality in tropical and sub-Saharan countries. Such as for many pathogens, preventive immunotherapy is presently either ineffective or non applicable due to socio-economics. A tremendous number of studies have showed that malaria incidence and outcomes are highly influenced by the genetic background of the host. Indeed, numerous markers of diverse influence involving HLA alleles [1, 2], TNF- α or NOS2 promoter polymorphisms [3-5], has been implicated in the disease development, implying that complete protection against malaria infection requires multifactorial immunity [6].

The disease caused by the invasion of parasitic protozoa of the genus *Plasmodium* into erythrocytes, is by itself dominated by clinical symptoms arisen through the release of parasite-derived toxins during blood-stage developmental cycle of the parasite, which are glycolipids, predominantly of the glycosylphosphatidylinositols (GPIs) class [7].

In this context, CD1 antigens are lipids and glycolipids (including GPIs)-presenting molecules to T cells, encoded by five closely linked genes (CD1-A to CD1-E) [8]. Previously thought to be non-polymorphic, the CD1 loci has been recently showed to present some level of diversity, especially for CD1-A and CD1-E genes, with two and six alleles respectively [9, 10], raising hence the question about the potential implication of this polymorphism in immune CD1-restricted response.

The possible ability for CD1 molecules to bind and present GPIs antigens from *P. falciparum* parasites to T cells, together with the recent demonstration of an NKT cells mediated protection against mouse malaria in mice models [11], make tempting to investigate whether CD1-A and CD1-E genes polymorphism could be related to both asymptomatic and mild malaria.

Methods. To evaluate the influence of such polymorphism on *P. falciparum* malaria, two groups of schoolchildren from the village of Dienga (South Eastern Gabon) were studied.

The first one, randomly recruited during a period of 4 months, corresponding to the main peak of malaria transmission occurring during the rainy season (February to May 1995), consisted of 85 children and was used to test the potential association of CD1 polymorphism with asymptomatic *P. falciparum* infection (prevalence and multiplicity). The presence of parasites was determined by thick blood smear and when negative, by nested-PCR determination (using MSA-2 gene locus). Uninfected children were defined as those that never had parasites in their blood whereas asymptomatic infection is defined by parasite detection (parasite density $\leq 800/\mu\text{L}$) without clinical symptoms of malaria.

In the second group, 85 schoolchildren also were clinically followed from February 1995 to March 1996, a period during which malarial attacks have been recorded when a febrile episode defined by an axillary temperature $>37.5^{\circ}\text{C}$, was associated with *P. falciparum* parasitemia $>800/\mu\text{L}$.

Within the two groups, CD1-A and CD1-E polymorphism analysis was performed as previously described [9, 10].

Results. The results are summarized in table.

In the first group, the statistical analysis failed to reveal any association between the CD1-A and CD1-E polymorphisms and the prevalence of asymptomatic infection, even if the number of patients with asymptomatic infection is higher in the group homozygous for CD1-E*02 allele than in the non-homozygous one (53.8% vs. 40%). Moreover, in this group, analysis of the multiplicity of asymptomatic infections (defined as the mean number of parasite genotypes per infected sample) related to the different CD1 genotypes did not showed significant differences between the different CD1-A genotypes (CD1-A*02/A*02: 2.01 vs. CD1-A*01/A*02: 2), but revealed a greatest number of multiple infections in individuals homozygous for the CD1E*02 allele as compared to the other genotypes (2.2 vs. 1.6

respectively), which could suggest that patients homozygous for this allele have more antibodies against *Plasmodium* than the heterozygous one.

The most striking finding concern the long-term followed group where CD1-E*02 homozygosity is associated with low frequency of malarial attacks (CD1-E*02/E*02: 47.7% vs. CD1-E*02/En: 80%; $P = 0.015$, Chi-square test). In addition, the distribution of CD1 genotypes in children with 0, 1 and more than 1 malarial attacks, shows strong association between CD1E*02 allele at homozygous state and resistance against multiple malarial attacks ($P < 0.005$, Chi-square test).

In this group, the distribution of CD1A alleles related to mild malaria reveals no association between these alleles and the prevalence of malarial attacks. However, the weak association of the low mean number of malarial attacks with CD1-A*01/A*02 genotype (CD1-A*02/A*02: 2 vs. CD1-A*01/A*02: 1.1; $U = 79$; $P < 0.05$; Mann-Whitney test) is likely related with a linkage disequilibrium between CD1-A*01 and CD1-E*02 allele which is associated with protection against malarial attacks.

Discussion. Our findings plead strongly in favor of a direct involvement of CD1-E molecules in conferring protection against malaria in this geographical area. However, although these MHC-class I like antigens are expressed intracellularly, it is not known yet whether they are expressed on the cell surface also or are involved in T-cell interaction.

Nucleotide sequence alignment of the CD1-E variants revealed that the only difference between E*01 and E*02 alleles, from glutamine to arginine (Q79R), lie at position 79 of the $\alpha 1$ -heavy chain domain. Interestingly, a recent study has showed that Arg79 is a crucial amino acid of mouse CD1-d molecule for glycolipid ligand presentation to NKT cells, involved both in antigen binding and in TCR recognition [12]. Accounting also for its importance, the Arg79 is shared by both CD1-B and CD1-C molecules, which are known to be involved in CD1 restricted immune response against various pathogens [13]. Furthermore, the recently

established crystallographic model of CD1-B molecules, revealed that inositol ring of a phosphatidylinositol molecule protrudes from the groove and lies on the α -helical surface in the predicted region of T-cell receptor binding, which involves Arg 79 [14]. Hence it seems reasonable to conceive that the amino acid difference observed between CD1-E*01 and CD1-E*02 is tightly related with protection against malaria either by the selection of an efficient parasitic epitope or by a better T-cell interaction or by both in case of antigen presentation by CD1E molecules.

One other important fact arguing towards a potential implication of CD1 molecules in anti-malarial immunity is highlighted by the capacity of α -Galactosylceramide, a glycolipid known to selectively activate V α 14 NKT cells in the context of CD1-d molecules, to mediate protection against murine malaria through a rapid and strong antiparasite activity inhibiting the development of intrahepatocytic stages of the rodent malaria parasites (*Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei*) [11].

Finally, Naik *et al.* have demonstrated that individuals residing in malaria-endemic areas develop an age-dependant *P. falciparum*-specific anti-GPI antibody response correlated with protection against malaria-related febrile illness [15]. They showed also that the lipid moiety (phosphate-inositol) of GPIs is the antigenic structure against which specific anti-GPI antibodies are directed, opening hence the question about the potential involvement of CD1 molecules in this anti-malarial humoral response. It should be of interest to investigate in future studies whether such antibody response may be influenced by CD1-E genotype.

Our findings, together with the data reported above opened the thought about the role of CD1-E molecules which could involve in antimalarial response through a cell surface expression or by intervening in the endosomal pathway of potential parasite epitopes. However, we cannot exclude in this work, the possibility that alleles of CD1-A locus in linkage disequilibrium with CD1-E are under the protective mechanism against the disease.

However, the two loci are the most distant CD1 genes, and at the present time only a two CD1A alleles differing by a synonymous change have been reported [8].

The last interesting point is represented by the fact that an anthropological study presently in progress, revealed that CD1-E*02 allele is over-represented in 145 Africans from Gabon compared to 180 Caucasians from France (87% vs. 36%; $p < 0.001$) [data not shown]. This could be in favour of positive selection of this allele and may be a consequence of its probable protective effect against clinical malaria.

References

1. Hill AV, Elvin J, Willis AC, et al. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* **1992**; 360(6403):434-9.
2. Migot-Nabias F, Luty AJ, Minh TN, et al. HLA alleles in relation to specific immunity to liver stage antigen-1 from *plasmodium falciparum* in Gabon. *Genes Immun* **2001**; 2(1):4-10.
3. Mombo LE, Ntoumi F, Bisseye C, et al. Human genetic polymorphisms and asymptomatic *Plasmodium falciparum* malaria in Gabonese schoolchildren. *Am J Trop Med Hyg* **2003**; 68(2):186-90.
4. Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, et al. Nitric oxide synthase 2 (Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis* **2001**; 184(3):330-6. Epub 2001 Jun 26.
5. Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, et al. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* **2002**; 360(9344):1468-75.
6. Weatherall DJ, Clegg JB. Genetic variability in response to infection: malaria and after. *Genes Immun* **2002**; 3(6):331-7.

7. Channe Gowda D. Structure and activity of glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*. *Microbes Infect* **2002**; 4(9):983-90.
8. Moody DB, Porcelli SA. Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **2003**; 3(1):11-22.
9. Han M, Hannick LI, DiBrino M, Robinson MA. Polymorphism of human CD1 genes. *Tissue Antigens* **1999**; 54(2):122-7.
10. Tamouza R, Sghiri R, Ramasawmy R, et al. Two novel CD1E alleles identified in black African individuals. *Tissue Antigens* **2002**; 59(5):417-20.
11. Gonzalez-Aseguinolaza G, de Oliveira C, Tomaska M, et al. alpha - galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**; 97(15):8461-6.
12. Kamada N, Iijima H, Kimura K, et al. Crucial amino acid residues of mouse CD1d for glycolipid ligand presentation to V(alpha)14 NKT cells. *Int Immunol* **2001**; 13(7):853-61.
13. Gumperz JE, Brenner MB. CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol* **2001**; 13(4):471-8.
14. Gadola SD, Zaccai NR, Harlos K, et al. Structure of human CD1b with bound ligands at 2.3 Å, a maze for alkyl chains. *Nat Immunol* **2002**; 3(8):721-6.
15. Naik RS, Branch OH, Woods AS, et al. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med* **2000**; 192(11):1563-76.

Table: Distribution of CD1 genotypes related to *P. falciparum* infection in Gabonese schoolchildren [*: MA means malarial attacks]

CD1 genotypes	Prevalence of <i>P. falciparum</i> infections (N=85)				Long term follow up -Malarial attacks (N=85)			
	Uninfected	Asymptomatic	Symptomatic	P	Without MA*	With 1 MA*	With 2 or more MA	P
CD1-E2/E2	17 (26.2%)	35 (53.8%)	13 (20%)	P = 0.3	34 (52.3%)	20 (30.8%)	11 (16.9%)	P <0.005
CD1-E2/E1, E2/E5	9 (45%)	8 (40%)	3 (15%)		4 (20%)	5 (25%)	11 (55%)	
CD1-E2/E6, E1/E5								
CD1-A02/A02	22 (31.4%)	34 (48.6%)	14 (20%)	P >0.9	31 (44.3%)	18 (25.7%)	21 (30%)	P = 0.15
CD1-A01/A02	4 (26.7%)	9 (60%)	2 (13.3%)		7 (46.7%)	7 (46.7%)	1 (6.6%)	

5. DISCUSSION

Les résultats contenus dans cette étude montrent les associations entre les facteurs génétiques de l'hôte africain et la susceptibilité ou la résistance aux infections palustres non graves (asymptomatique et simple). Outre le trait drépanocytaire déjà analysé en partie par Ntoumi *et al.* [Ntoumi F *et al.*, 1997], les facteurs génétiques de l'hôte regroupent les facteurs érythrocytaires (système ABO et G6PD), les facteurs immunitaires solubles (TNF α et NOS2) et les molécules présentatrices d'antigènes non peptidiques récemment identifiés (CD1).

5-1. FACTEURS ERYTHROCYTAIRES

Pour éviter de paraphraser la discussion contenue dans les publications afférentes, nous avons analysé conjointement les résultats obtenus sur les facteurs génétiques, concernant chacune des 2 formes d'infections palustres étudiées (simple et asymptomatique).

5-1-1. Le trait drépanocytaire

L'analyse déjà publié du trait drépanocytaire chez les enfants de la localité de Dienga, montre une association avec une faible prévalence de l'infection palustre asymptomatique [Ntoumi F *et al.*, 1997]. L'implication du trait drépanocytaire dans la résistance à l'infection palustre, nous l'avons aussi mise en évidence dans le fait que les enfants porteurs de cette anomalie génétique, comparativement aux autres enfants dits "normaux" (Hb AA), tolèrent des densités parasitaires plus élevées ($P = 0,031$). Une fréquence élevée d'infections asymptomatiques multiples à *P. falciparum* chez les enfants porteurs d'hémoglobine AS [Ntoumi F *et al.*, 1997], indique une des explications possibles de l'effet protecteur du trait drépanocytaire. Cet effet protecteur serait dû, chez ces sujets, à une exposition à un large répertoire d'antigènes plasmodiaux.

L'absence d'association entre portage de l'hémoglobine AS et infection palustre simple dans notre première analyse, a permis d'évoquer, chez les enfants pré-adolescents, la perte de l'effet bénéfique du trait drépanocytaire. Ainsi, l'effet bénéfique du trait drépanocytaire s'estompe, car moins important que l'immunité clinique anti-palustre qui se met en place dans cette tranche d'âge. Une récente étude, au Kenya, a montré que le trait drépanocytaire est associé à une réduction de la mortalité dû au paludisme chez les enfants de 2 à 16 mois mais pas au-delà [Aidoo M *et al.*, 2002]. En dehors de ce fait majeur, la stratégie de notre étude, consistant à comparer 2 groupes différents par la présence ou l'absence d'accès palustres, comporterait un biais que l'on aurait pu résoudre en opposant le trait drépanocytaire au nombre d'accès palustres. Ce cheminement est effectivement exploité dans d'autres études [Joishy SK *et al.*, 1988].

En définitive, le trait drépanocytaire contribue à la résistance face aux infections palustres (asymptomatique, simple et grave), mais cette protection est particulièrement marquée chez l'enfant après la chute des anticorps maternels et avant la mise en place de l'immunité acquise anti-palustre.

5-1-2. Le système ABO

De nombreux résultats ont alimenté un débat contradictoire concernant l'influence des antigènes des groupes sanguins sur la densité parasitaire [Lell B *et al.*, 1999; Akinboye DO *et al.*, 1987]. Nos résultats montrent que les antigènes O sont associés, d'une part à une faible densité parasitaire et d'autre part à une prévalence élevée d'infections asymptomatiques palustres. Ils suggèrent un effet protecteur de ces antigènes, actif contre les premiers stades de l'infection palustre et qui entraînant ainsi une infection palustre asymptomatique.

Outre l'effet "anti-rosetting" protégeant les sujets ne portant pas les antigènes A contre les infections palustres graves [Barragan A *et al.*, 2000], d'autres éléments en rapport avec la

résistance aux accès simples palustres pourraient être évoqués à l'exemple de la préférence marquée par les vecteurs *Anopheles gambiae* (majoritaires dans notre région d'étude) à s'attaquer aux sujets de groupe sanguin O [Wood CS *et al.*, 1974]. La formation en rosette ou "rosetting" n'est pas spécifiquement liée à une forme grave précise du paludisme, mais elle semble proportionnelle à la sévérité du paludisme [Rowe A *et al.*, 1995]. Elle demeure vraisemblablement présente pendant les accès simples de paludisme, et 2 études ont révélé un lien entre le "rosetting" et le taux plasmatique de TNF- α [Allan RJ *et al.*, 1993; Ringwald P *et al.*, 1993]. Cette association, non encore élucidée complètement, contribuerait à expliquer en partie la résistance des individus ayant des antigènes O vis-à-vis des accès simples palustres.

5-1-3. La déficience en G6PD

Nos résultats obtenus sur la relation entre le variant génétique de la déficience en G6PD (G6PD A-) et chacune des deux formes étudiées de l'infection palustre (asymptomatique et simple), sont particulièrement contrastés. Les filles hétérozygotes G6PD A- présentent une faible prévalence de l'infection palustre asymptomatique (seconde publication) alors que dans la première publication, elles sont susceptibles à l'accès palustre simple. Cette divergence de résultats peut être la conséquence de la petite taille de notre cohorte de filles ou de l'inactivation du chromosome X. Mais cette divergence est aussi en partie le résultat de la répartition peu appropriée en 2 groupes (accès palustre *vs.* sans accès palustre) qui ne prend pas en compte le nombre d'accès palustres. Concernant les garçons, nos résultats sont concordants et montrent qu'il n'y a pas d'association du variant G6PD A- ni avec l'infection asymptomatique, ni avec l'infection simple.

Les résultats de notre seconde étude concernant l'infection asymptomatique, joints à ceux de la littérature concernant les autres formes d'infections palustres, suggèrent que le variant

G6PD A- a un effet protecteur contre l'infection palustre qui s'exerce quelque soit la forme de celle-ci (asymptomatique, simple ou grave).

Nous avons proposé un mécanisme d'action (voir figure 3) de cet effet protecteur, qui a lieu différemment selon le sexe du sujet (le gène de la G6PD étant lié au chromosome X) :

Chez les garçons, cet effet protecteur n'est pas opérationnel puisque les parasites s'adaptent au bout de quelques cycles dans les cellules à G6PD A-, en utilisant leur propre G6PD. Une récente étude de Sodeinde O *et al.* montre bien une expression plus réduite des ARN messagers de PfG6PD (G6PD de *P. falciparum*) dans les parasites des cellules G6PD-déficientes que dans ceux des cellules G6PD-normales [Sodeinde O *et al.*, 2003]. Lors d'accès palustres graves chez les garçons, l'effet protecteur dû au variant G6PD A- est opérationnel. Il a été quantifié à 58% dans une large étude de Ruwende C *et al.* [Ruwende C *et al.*, 1995]. Le rétablissement de cet effet protecteur est dû au fait qu'étant dans des conditions de stress oxydatif intense, la Pf.G6PD est utilisée à son but premier qui est la défense de la cellule contre les lésions oxydatives. Ainsi elle ne peut plus compenser la déficience en G6PD des cellules de l'hôte, laissant se développer le pouvoir parasiticide des cellules G6PD-déficientes humaines, observé lors d'expériences *in vitro* de Roth EF *et al.* [Roth EF *et al.*, 1983].

Chez les filles, l'effet protecteur contre l'infection palustre conféré par les cellules G6PD-déficientes, est présent grâce au fait que les parasites qui infectent tantôt les cellules G6PD-déficientes tantôt les cellules G6PD-normales, n'arrivent pas à s'adapter, donc à se multiplier. La "mosaïcité" des cellules chez les filles hétérozygotes G6PD A-, permettrait l'action de l'effet protecteur, somme toute relative à la succession hasardeuse de types (G6PD-déficiente ou pas) de cellules infectées. Cet effet protecteur, quantifié quelque peu logiquement en deçà de celui chez les garçons (46% vs. 58%) [Ruwende C *et al.*, 1995], est en plus influencé par le phénomène d'inactivation du chromosome X. Toutes ces influences

conjuguées permettraient d'expliquer des résultats parfois contradictoires, concernant l'effet protecteur du variant G6PD A- contre l'infection palustre chez les filles hétérozygotes, enregistrés dans plusieurs études.

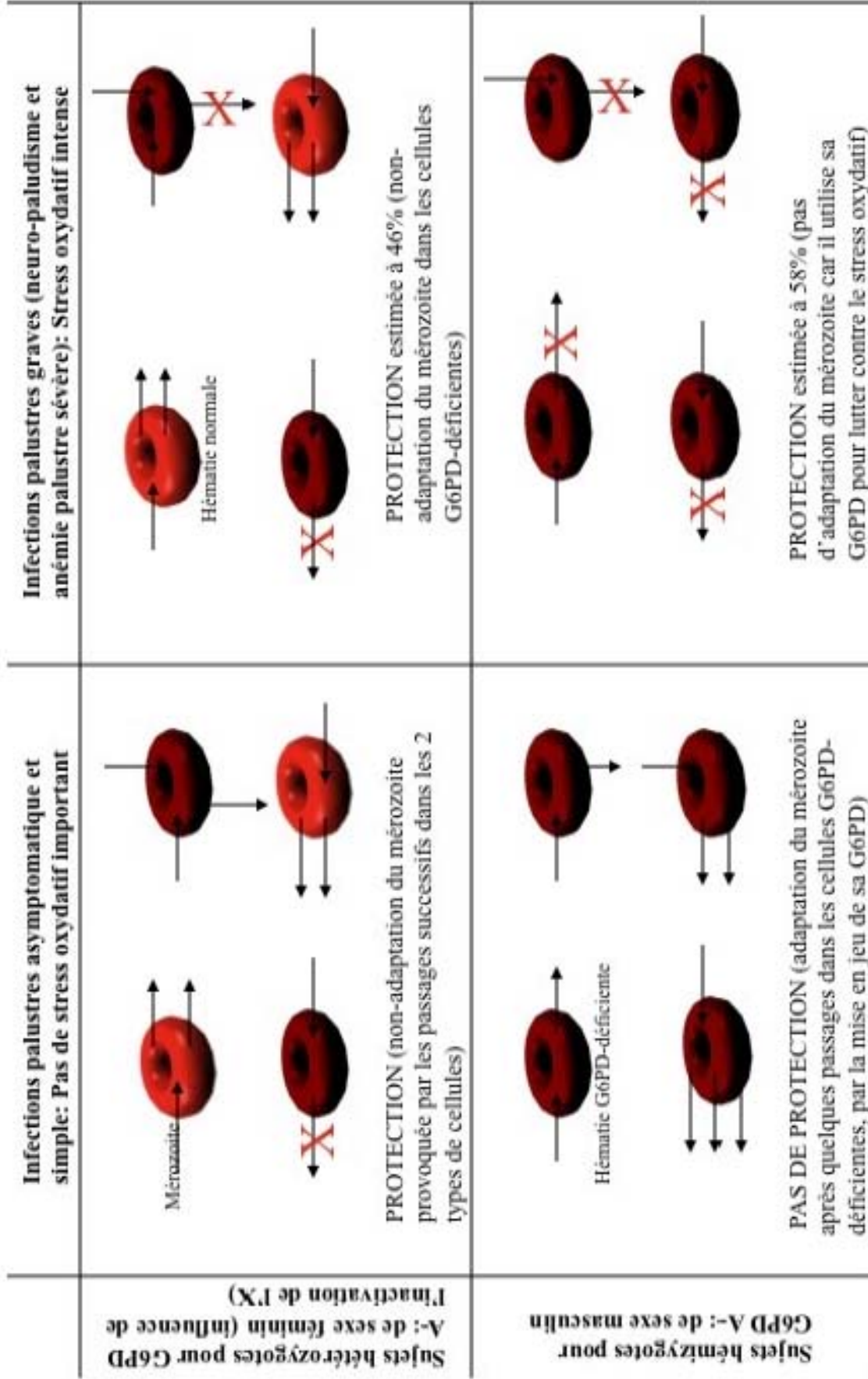


Figure 3: Hypothèses de mécanismes d'action de l'effet anti-palustre dû au variant génétique G6PD A-

5-2. FACTEURS IMMUNITAIRES SOLUBLES

Les facteurs immunitaires solubles (TNF α , INF γ , Interleukines, NO et autres cytokines) sont fortement impliqués dans la défense anti-palustre. Ils peuvent par action sur les monocytes, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, induire la phagocytose des parasites ou celle des érythrocytes infectés. En outre, ils peuvent, par les voies ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) et/ou ADCI (antibody dependent cellular inhibition), agir de nouveau sur les monocytes, et ainsi ces derniers entraînent des phénomènes de cytotoxicité et une inhibition du développement des parasites. Enfin, ces facteurs immunitaires solubles ont aussi la possibilité d'induire la libération d'autres cytokines et des radicaux oxygénés.

5-2-1. Le facteur alpha de nécrose des tumeurs (TNF- α)

La cytokine pro-inflammatoire TNF- α joue un rôle primordial dans la pathogenèse de l'infection palustre (voir figure 2). L'influence du polymorphisme de la région promotrice du gène TNF- α sur la susceptibilité et la résistance au paludisme, témoigne de la primauté de cette cytokine. Parmi les nombreux polymorphismes du gène TNF- α , deux seraient fonctionnels :

- le TNF- α ₋₃₀₈ dont l'un des allèles augmente la transcription du gène TNF- α [Wilson AG *et al.*, 1997], et entraîne chez les sujets homozygotes comme chez les sujets hétérozygotes, une susceptibilité accrue au paludisme.
- le TNF- α ₋₃₇₆ dont l'une des formes alléliques augmente l'expression du gène en recrutant le facteur de transcription OCT1 et provoque un risque quadruple de développer un paludisme cérébral [Knight JC *et al.*, 1999].

Un troisième polymorphisme, le TNF- α ₋₂₃₈, a été associé à la susceptibilité au paludisme, Il correspond à un risque accru d'anémie palustre sévère en Gambie [McGuire W *et al.*, 1999].

Nos résultats ne montrent aucune association entre les polymorphismes du gène TNF- α (TNF- α_{-308} et TNF- α_{-238}) et la présence ou l'absence d'accès simple de paludisme. En revanche, l'une des formes alléliques de TNF- α_{-238} est associée à un taux élevé d'anticorps dirigés contre les peptides parasitaires MSA-2 et RAP-1. Ce résultat unique est conforté par l'association révélée entre ce même allèle et une multiplicité (nombre de génotypes parasitaires différents) élevée d'infections asymptomatiques palustres. Les sujets porteurs de cet allèle TNF- α_{-238A} , présentent ainsi un large répertoire d'antigènes parasitaires et un taux élevé d'anticorps. Ces sujets acquerraient alors plus rapidement une immunité clinique contre les accès de paludisme.

L'influence fonctionnelle de cet allèle TNF- α_{-238A} serait soit quantitatif, via le déséquilibre de liaison le liant à l'allèle TNF- α_{-376A} [Knight JC *et al.*, 1999], soit qualitatif, via l'induction préférentielle de la forme soluble de TNF- α [Goldfeld AE *et al.*, 1996].

En dehors de cet effet protecteur conféré par l'allèle TNF α_{-238A} , deux études ont établi un effet de susceptibilité accrue à l'anémie palustre sévère, qui serait la conséquence à long terme d'une infection à faible charge parasitaire. En effet, l'infection asymptomatique est associée à l'élimination de globules rouges infectés, qui prolongée dans le temps aboutirait à une anémie.

En outre, l'allèle TNF α_{-238A} pourrait être l'objet d'une sélection particulière, compte tenu de sa fréquence élevée chez les Africains sub-Sahariens par rapport aux Afro-américains. Cette sélection résulterait des interactions entre les deux forces en présence, la résistance à l'infection clinique montrée par notre étude et par les travaux de Knight *et al.* vs. la susceptibilité à l'anémie palustre sévère mis en évidence par les résultats de McGuire *et al.*

Concernant le polymorphisme TNF α_{-308} , et même si nos résultats ne sont pas statistiquement concluants, il se dégage une proposition qui tend à confirmer l'effet protecteur

de l'allèle $TNF\alpha_{-308A}$ contre le paludisme, observé par d'autres études [McGuirre W *et al.*, 1994; Wattavidanage J *et al.*, 1999].

5-2-2. Le NO Synthetase inductible (NOS2)

L'implication du NO et, par extension, celle du NOS2 dans les mécanismes de défense contre l'infection palustre n'est plus à démontrer, seule reste son élucidation. La production de NO et de NOS2 a été associée à un effet protecteur contre le paludisme et contre la sévérité de la maladie [Anstey NM *et al.*, 1996; Chiwakata CB *et al.*, 2000; Hobbs MR *et al.*, 2002; Lopansri BK *et al.*, 2003]. Mais la molécule NO produite en excès, contribuerait à certains mécanismes pathologiques.

Nos résultats, même s'ils ne révèlent pas d'associations significatives, tendent à montrer, chez les sujets hétérozygotes $NOS2_{-954}$, une fréquence élevée de l'infection asymptomatique palustre, des densités parasitaires élevées et un nombre important de différents génotypes parasitaires. Cette tendance, entrevue au niveau de l'infection asymptomatique, est à nouveau observée concernant l'infection palustre simple. Ces mêmes sujets hétérozygotes, tendent à présenter une prévalence faible d'accès simple de paludisme ($P = 0,09$).

Dans une étude de Kun *et al.* à Lambaréné (Gabon), la forme allélique $NOS2_{-954C}$, est associée, de manière significative, à un effet protecteur contre la réapparition d'accès de paludisme [Kun JF *et al.*, 1998]. Les sujets hétérozygotes $NOS2_{-954C}$, qui tendent à tolérer des densités parasitaires élevées dans notre étude, ont été retrouvés avec une enzyme NOS inductible présentant une activité basale sept fois plus importante que chez les sujets "normaux" [Kun JF *et al.*, 2001].

La production de NO confère bien un effet de résistance au paludisme, son association avec une susceptibilité au paludisme cérébral proviendrait des difficultés d'analyses relatives aux

différents milieux où est évalué le NO (dans le sang, les urines et les fluides cérébro-spinaux) [Burgner D *et al.*, 1999; Weiss G *et al.*, 1998].

Le deuxième polymorphisme (microsatellites CCTTT sur 2,5 kb) dans la région promotrice du gène NOS2 n'a révélé jusqu'à présent aucune activité fonctionnelle. Un impact fonctionnel baissant la production de NO, pourraient expliquer son association avec le paludisme sévère. Ces 2 polymorphismes de la région promotrice du gène NOS2, présenteraient une hétérogénéité géographique en terme d'association avec la susceptibilité ou la résistance au paludisme [Levesque MC *et al.*, 1999]. Cette hétérogénéité peut être la conséquence du fait que ces 2 polymorphismes pourraient être en déséquilibre de liaison avec un autre polymorphisme encore inconnu mais réellement associé à l'infection palustre. En effet, un troisième polymorphisme, -1173C→T, est en déséquilibre de liaison avec les microsatellites CCTTT, et il est associé à une production accrue de NO et à une protection contre le paludisme grave [Hobbs MR *et al.*, 2002].

Les 2 polymorphismes du gène NOS2, -1173C→T et -954G→C, sont indépendants mais ils fonctionneraient selon le même mécanisme pour susciter l'effet de protection contre le paludisme (voir figure 4).

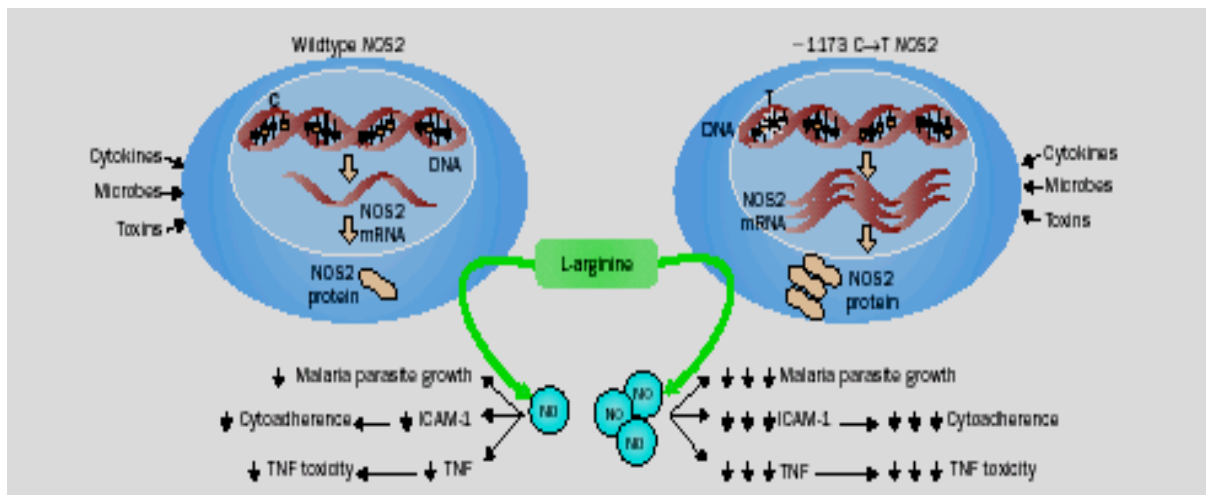


Figure 4: Mécanisme proposé de protection contre l'infection palustre dû aux polymorphismes du gène NOS2 -1173C→T et -954G→C [Extrait de Hobbs MR *et al.*, 2002]

5-3. MOLÉCULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNES NON PEPTIDIQUES

Les molécules CD1, présentatrices d'antigènes non conventionnels (glycolipidiques et lipidiques), sont réparties en deux groupes selon leurs homologies de séquences nucléotidiques et peptidiques. Fonctionnellement, la présentation des antigènes microbiens (défense anti-infectieuse) serait effectuée par les molécules du groupe I (CD1A, B, C et E), tandis que la présentation des antigènes du soi (auto-immunité) serait opérée par la molécule du groupe II (CD1D) [Dascher CC *et al.*, 2003; Shamshiev A *et al.*, 2002]. Mais cette division fonctionnelle n'est pas strictement tranchée car on retrouve la molécule du groupe I, CD1B, impliquée dans les mécanismes d'auto-immunité [Shamshiev A *et al.*, 1999; Moody DB *et al.*, 2002]. En outre, la molécule CD1D est clairement impliquée dans l'immunité anti-infectieuse [Duthie MS *et al.*, 2002; Jayawardena-Wolf J *et al.*, 2001]. Parmi les gènes des molécules impliquées dans la défense anti-infectieuse, seuls les gènes de CD1A et CD1E présentent des mutations modifiant la séquence peptidique.

5-3-1. Le polymorphisme du gène CD1E

Dans le but d'établir une stratégie de génotypage des allèles CD1, nous avons découvert par séquençage direct deux nouveaux allèles CD1E, et nous avons proposé une nomenclature des allèles CD1E. Au départ définis comme peu polymorphes, les gènes CD1 révèlent à travers le CD1E un seul gène polymorphe avec aujourd'hui 6 allèles connus. Cette différence de degré de polymorphisme par rapport aux autres gènes CD1, pourrait suggérer que la molécule CD1E assume une fonction plus importante en terme d'immunité à la lumière du haut degré de polymorphisme présent en ce qui concerne les molécules du HLA. La molécule CD1E, bien qu'appartenant au groupe I, possède des caractéristiques intermédiaires des deux groupes CD1, qui pourraient lui permettre de former un troisième groupe [Jullien D *et al.*, 1999; Angenieux C *et al.*, 2000].

5-3-2. Les allèles CD1E et CD1A

A travers le profil des polymorphismes des gènes CD1E et CD1A dans deux populations génétiquement différentes, nous constatons que les allèles CD1A ont pratiquement la même fréquence dans les deux populations. Dans le même temps, les allèles CD1E présentent des fréquences significativement différentes avec, en point de mire, les allèles E*01 et E*02 qui sont prévalents de manière opposée dans chacune des deux populations. Cette sélection de l'un ou l'autre des allèles selon la population, montre l'évolution de ces allèles en fonction de l'environnement, et elle suggère des avantages conférés par chaque allèle en fonction du milieu propre à chaque population.

Le déséquilibre de liaison entre les allèles E*02 et A*01 (tous les sujets porteurs de l'allèle A*01 étant homozygotes pour l'allèle E*02) pourrait nous laisser sous-entendre des interactions entre les molécules CD1E et CD1A. Ce rôle des molécules CD1E dans

l'expression des autres molécules CD1, a été d'ailleurs évoqué par Angénieux *et al.* lors de la caractérisation de la molécule CD1E [Angenieux C *et al.*, 2000].

5-3-3. Le CD1E et l'infection palustre

Compte tenu de la sélection positive de l'allèle E*02 dans les populations africaines [données non publiées], nous avons recherché quels avantages pourrait conférer cet allèle. Nous avons ainsi démontré l'association de l'allèle E*02 à l'état homozygote avec la résistance à l'infection palustre simple, et surtout avec la résistance à plusieurs accès palustres.

Bien que l'implication de la molécule CD1E dans la défense anti-palustre soit ici mise en évidence, il demeure difficile de définir précisément cette implication puisque sa fonction biologique est jusqu'alors complètement inconnue.

Néanmoins, en scrutant les molécules glycolipidiques parasitaires, on note que les glycosylphosphatidylinositols (GPI) sont impliqués dans les mécanismes immunitaires de l'infection palustre dans plusieurs études [Gowda DC *et al.*, 1999; Davidson EA *et al.*, 2001]. Les anticorps anti-GPI sont associés à une protection contre les infections palustres simple et sévère [Naik RS *et al.*, 2000; de Souza JB *et al.*, 2002; Schofield L *et al.*, 1993; Schofield L *et al.*, 2002]. Schofield *et al.* montrent en particulier que les anticorps IgG anti-GPI sont régulés en partie par la reconnaissance des molécules GPI par les lymphocytes NKT CD1D-restreints à laquelle fait suite la sécrétion de l'interleukine-4 par les cellules T CD4⁺ [Schofield L *et al.*, 1999]. Une contradiction est apportée par les travaux de Molano *et al.* qui montrent que les anticorps anti-GPI impliqués dans la résistance à l'infection palustre, ne dépendent pas de la molécule CD1D mais plutôt des molécules du système HLA de classe II [Molano A *et al.*, 2000].

Une autre molécule glycolipidique mais d'origine marine (éponges), l' α -galactosylceramide (α GalCer) a été également impliquée dans la défense anti-palustre. Gonzalez-Asequinolaza *et al.* ont montré par l'activation des cellules NKT, que cette molécule entraînait la sécrétion de l'interféron- γ (INF γ) avec, comme finalité, l'inhibition des stades hépatiques de l'infection palustre chez les hôtes murins [Gonzalez-Asequinolaza G *et al.*, 2000]. En outre, cette reconnaissance des cellules NKT CD1-D-restreintes par l' α GalCer entraînait aussi la stimulation d'autres lymphocytes NK, T et B [Burdin N *et al.*, 1999; Nishimura T *et al.*, 2000]. A l'heure actuelle, seules ces deux molécules glycolipidiques (GPI et α GalCer) ont été mises en évidence comme antigènes présentés par les molécules CD1 dans l'immunité anti-palustre.

Le mécanisme de l'intervention de la molécule CD1E dans la défense anti-palustre pourrait suivre deux voies, directe et indirecte :

a) La voie indirecte

Elle est déterminée par les résultats de la caractérisation de la molécule CD1E par Angenieux *et al.* Cette molécule, définie comme intracellulaire (pas d'expression à la surface cellulaire), apparaît impliquée dans le programme de maturation des cellules dendritiques, et elle influencerait l'expression et le processus de présentation antigénique des autres molécules CD1 [Angenieux C *et al.*, 2000]. Ces autres molécules CD1 auraient un rôle dans les mécanismes de défense, dépendant du groupe auquel elles appartiennent.

Ainsi les molécules CD1 du groupe I sont-elles reconnues par les lymphocytes T auxiliaires CD1A, B, C-restreints qui vont produire des cytokines de type Th1 (INF γ) lors des réponses immunitaires à médiation cellulaire [Gumperz JE *et al.*, 2001]. Ces cytokines Th1 activent les lymphocytes T cytotoxiques parmi lesquels, les cellules CD4⁻CD8⁻ qui entraînent la lyse des macrophages infectés par l'intermédiaire du système Fas/Fas ligand, et les cellules CD4⁻CD8⁺

qui utilisent les perforines ou la granulysine pour provoquer la lyse des parasites [Stenger S *et al.*, 1997; Spada FM *et al.*, 2000, JEM].

Quant à la molécule du groupe II, elle active les lymphocytes T auxiliaires CD1D-restreints qui vont déclencher une réponse immunitaire de type Th1 ou Th2 [Gumperz JE *et al.*, 2001]. Les cytokines Th1 (INF γ) secrétées, vont stimuler les lymphocytes NK (Natural killer) qui pourront inhiber le développement des formes parasitaires hépatiques [Schaible UE *et al.*, 2000; Porcelli SA *et al.*, 1999]. Par contre, les cytokines Th2 (Interleukine-4) vont activer les lymphocytes B qui vont produire les anticorps IgG contre l'infection [Schofield L *et al.*, 1999; Gumperz JE *et al.*, 2001]. La molécule CD1D active également les cellules NKT CD1D-restreintes qui influencent la polarité Th1/Th2 de la réponse immunitaire, le taux de cytokines pro-inflammatoires, la pathogenèse et le taux de mortalité dus à *P. berghei* ANKA (modèle murin du paludisme cérébral) [Hansen DS *et al.*, 2003].

b) La voie directe

La voie d'action directe des molécules CD1E, que nous préconisons, suppose que ces molécules sont directement engagées dans la présentation des antigènes glycolipidiques (ex: GPI) aux lymphocytes T auxiliaires. En effet l'allèle CD1-E*02 qui est associé à la protection contre les accès palustres dans notre étude, produit une protéine CD1E ayant un acide aminé Arginine en position 79 (Arg79) au niveau de l'hélice α du domaine α_1 , à la différence des autres molécules CD1E. Or Kamada *et al.* ont montré que cet acide aminé Arg79 est crucial pour la présentation antigénique aux cellules T par la molécule CD1D [Kamada N *et al.*, 2001]. Notre hypothèse est que la molécule CD1E des individus homozygotes pour l'allèle E*02, serait plus efficace dans sa reconnaissance par les lymphocytes T.

Enfin, il n'est pas exclu que la molécule CD1E agisse à la fois de manière indirecte et directe concernant la présentation des antigènes glycolipidiques. Les analyses pour éclairer

l'implication des molécules CD1E et son déterminisme génétique dans l'infection palustre, sont à l'étude dans notre laboratoire.

B- FACTEURS GÉNÉTIQUES HUMAINS ET INFECTION À HIV

La 2^{ème} partie de notre travail de thèse est axé sur la relation entre les facteurs génétiques de l'hôte et la susceptibilité/résistance à l'infection à HIV-1 (virus de l'immunodéficience humaine type 1). Nous allons l'aborder par les généralités qui vont nous permettre de définir l'infection à HIV dans son ensemble et ensuite les facteurs génétiques humains impliqués dans cette infection.

1. GÉNÉRALITES

Dans les généralités, nous nous sommes intéressés au HIV, précisément au HIV-1 et à la physiopathologie de son infection. Ensuite, nous avons répertorié les différents facteurs génétiques de l'homme impliqués dans cette infection.

1-1. INFECTION A HIV

Après une note historique et un aperçu thérapeutique, nous allons égrainer les caractéristiques du HIV-1 et décrire le profil de l'infection qui survient après l'entrée de ce virus dans l'organisme humain.

1-1-1. Historique et actualités

Les premiers cas dans la littérature de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) sont diagnostiqués en 1981 aux Etats-Unis lors de pneumocystose [Gottlieb MS *et al.*, 1981; Masur H *et al.*, 1981]. Le virus responsable de ce syndrome est isolé pour la première fois à l'Institut Pasteur de Paris sous le nom de LAV (lymphadenopathy associated virus), puis par des équipes américaines sous le nom de HTLV-3 (human T-lymphocytotropic virus type III), avant d'être dénommé HIV-1 (virus de l'immunodéficience humaine type 1) par le comité de nomenclature des virus [Barré-Sinoussi F *et al.*, 1983; Gallo RC *et al.*, 1983]. Zhu *et al.* ont

pu démontrer la présence de HIV-1 dans un échantillon sanguin prélevé en 1959 [Zhu T *et al.*, 1998].

En 1986, un deuxième virus associé à l'immunodéficience humaine, est isolé à l'Institut Pasteur de Paris et il est dénommé HIV-2 [Clavel F *et al.*, 1986].

L'actualité de l'infection par les HIV, réside principalement sur le traitement de l'infection, qu'il soit curatif ou préventif. De nombreuses équipes travaillent sur les vaccins préventifs et curatifs dont on parlera sûrement dans les prochaines années voire les prochains mois. En attendant, c'est la prévention qui reste d'actualité, mais aussi le traitement antirétroviral qui est établi et qui a évolué en efficacité grandissante.

Avant le traitement antirétroviral, le bilan d'un patient séropositif HIV est nécessaire car il va aider à la décision thérapeutique. Ce bilan est constitué principalement de la détermination de la charge plasmatique virale et de la numération des lymphocytes T CD4. Ces indices seront fondamentaux pour le suivi de l'efficacité de la chimiothérapie antirétrovirale. Cette dernière sera définie comme efficace que lorsque la charge virale (c'est-à-dire la réplication du HIV) sera réduite en dessous d'un seuil de détection moyen de 50 copies d'ARN HIV par μL (seuil de détection moyen des tests commerciaux utilisés).

Les cibles des médicaments antirétroviraux sont de trois sortes :

- La transcriptase reverse dont deux types de molécules sont utilisés pour bloquer son action (analogues de nucléotides ou nucléosides et analogues non-nucléosidiques).
- La protéase dont les molécules peptidomimétiques, sont des inhibiteurs du site actif de l'enzyme.
- L'entrée du virus dans la cellule.

1-1-2. Eléments de biologie

Les virus de l'immunodéficience humaine (HIV) appartiennent à la famille des rétrovirus qui regroupe les virus équipés d'une enzyme structurale dénommée transcriptase inverse ou reverse transcriptase (RT). Cette enzyme a la propriété de synthétiser un ADN bicaténaire à partir de l'ARN viral d'où son nom. Les rétrovirus sont répartis en trois sous-familles :

- les oncovirus responsables de tumeurs et de leucémies
- les lentivirus entraînant des infections mortelles à longue période d'incubation à l'exemple des HIV
- les spumavirus étant non pathogènes [Klatt EC *et al.*, 1998].

Pour appréhender la biologie du HIV-1, (le virus concerné par notre travail) nous allons nous intéresser dans un premier temps à son aspect structurel puis à sa réplication avant de décrire sa diversité.

1-1-2-1. Structure du HIV-1

La particule virale HIV a un diamètre de 100 nm et elle est délimitée par une nucléocapside (capsule interne) qui comprend plusieurs protéines dont la p24 (24kD) et la p17 (17kD) [Rubbert A *et al.*, 2003]. Cette capside est entourée par une enveloppe virale (membrane externe lipidique) provenant par bourgeonnement de la membrane cytoplasmique de la cellule infectée (voir figure 5). Cette membrane externe porte une glycoprotéine de surface de 120kD (gp120) et une glycoprotéine transmembranaire de 41kD (gp41), toutes deux d'origine virale. Intérieurement, la particule virale mature possède un génome viral constitué de deux ARN courts de taille 9,2kb et des enzymes que sont la RT (p66), la protéase (p11), la ribonucléase et l'intégrase (p32) [Klatt EC *et al.*, 1998].

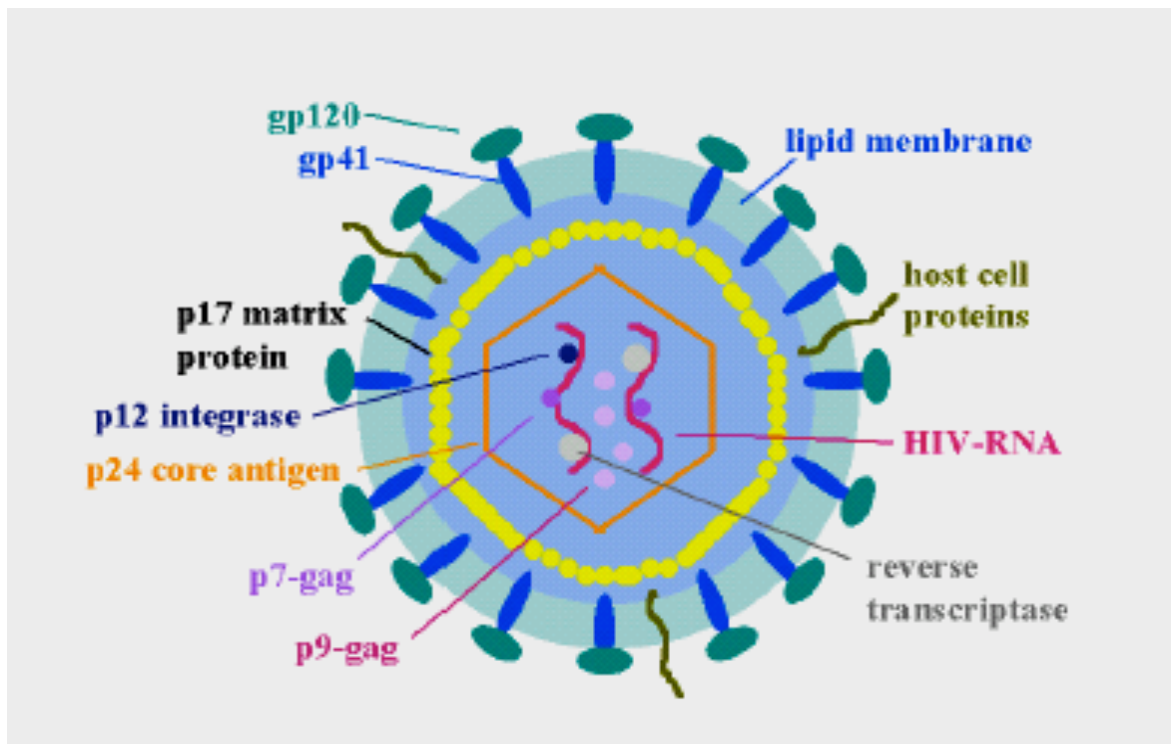


Figure 5: Structure de la particule virale HIV [Extraite de Rubbert A *et al.*, 2003]

Le génome du HIV-1 comporte 3 gènes majeurs appelées GAG (group-antigen), POL (polymerase) et ENV (enveloppe), qui codent dans l'ordre pour les antigènes de la nucléocapside, les enzymes (RT, protéase et intégrase) et les glycoprotéines de l'enveloppe virale (voir figure 6). Parmi les autres gènes, on note le gène VPR qui code pour une protéine de 14kDa impliquée dans les processus de mitose et de prolifération, et indispensable pour intégrer les noyaux des cellules n'étant pas en division [Emerman M *et al.*, 1996]. Les autres gènes viraux se répartissent en 2 groupes, les gènes TAT et REV qui codent pour des protéines de régulation, et les gènes NEF, VIF et VPU qui codent elles pour des protéines auxiliaires [Kieny MP *et al.*, 1990; Emerman M *et al.*, 1996]. Aux deux extrémités de l'ADN proviral, est présente une séquence répétitive LTR (long terminal repeat) permettant sa transcription et son intégration dans le génome cellulaire. La séquence LTR contient en outre des promoteurs de l'expression des gènes viraux tels que TAT [Emerman M *et al.*, 1996].

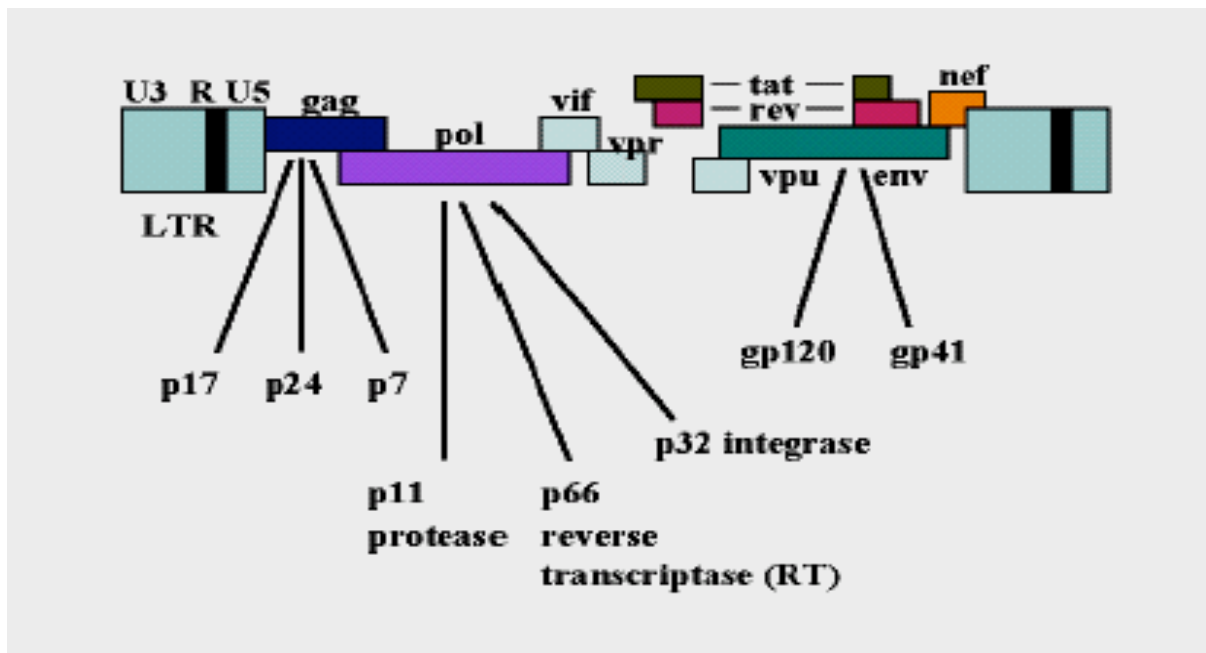


Figure 6: Organisation du génome viral du HIV [Extraite de Rubbert A *et al.*, 2003]

1-1-2-2. Réplication du HIV-1

La réplication est la reproduction d'un virus en copies de celui-ci, par l'intermédiaire d'un autre organisme. Le cycle de réplication du HIV comporte 6 étapes dont 4 se passent à l'intérieur de la cellule infectée : la pénétration, la transcription inverse, l'intégration à l'ADN cellulaire, la réplication proprement dite, l'assemblage et le bourgeonnement, et enfin la maturation en dehors de la cellule infectée (voir figure 7).

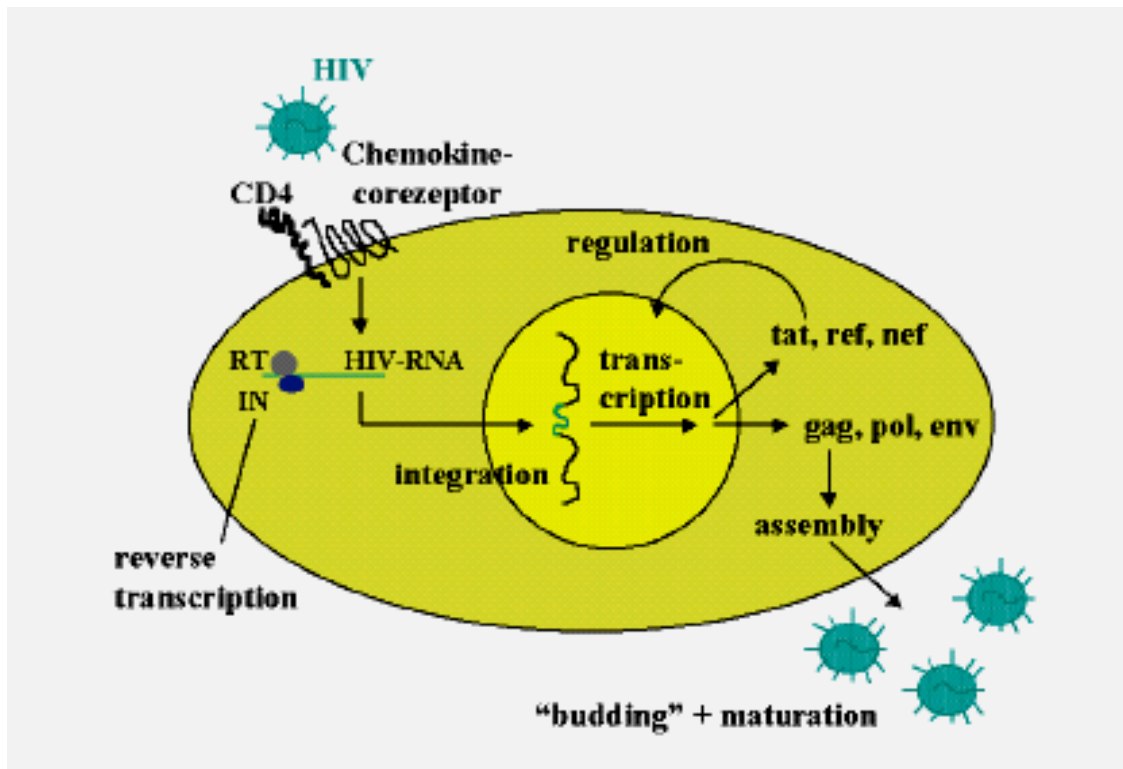


Figure 7: Cycle de réplication du HIV-1 [Extrait de Rubbert A *et al.*, 2003]

La pénétration du virus commence par la fixation, et pour se fixer sur la cellule cible, le virus par l'intermédiaire de la gp120 reconnaît un récepteur cellulaire qui est la molécule CD4. Parmi les cellules partageant ce récepteur et donc susceptibles à l'infection par le HIV, on compte les cellules du système des phagocytes mononuclées dont principalement les monocytes du sang circulant et les macrophages tissulaires, et dans une moindre mesure les cellules dendritiques de la peau (cellules de Langerhans) et des ganglions (cellules folliculaires), et les cellules microgliales du cerveau. Les lymphocytes T, B et NK mais aussi les cellules endothéliales sont également susceptibles à l'entrée du HIV par les récepteurs CD4 et ce sont précisément les lymphocytes T CD4 qui tiennent un rôle capital dans l'infection à HIV [Klatt EC *et al.*, 1998]. Chez les macrophages et chez certaines cellules ne présentant pas les récepteurs CD4 comme les fibroblastes, le HIV utiliserait pour entrer les récepteurs Fc ou les récepteurs du complément [McKeating JA *et al.*, 1990].

La liaison gp120-CD4 entraîne un changement de conformation de la glycoprotéine gp120 mais elle ne permet la fixation du virus que lorsqu'elle associe un co-récepteur à chémokines. Ce récepteur à chémokines est différent selon la cellule cible, CCR5 pour les monocytes/macrophages, et CXCR-4 pour les lymphocytes T CD4.

Après la fixation, a lieu la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire grâce au changement de conformation de la glycoprotéine trans-membranaire gp41 [Doms RW *et al.*, 1997]. Cette fusion est suivie par l'entrée de la capsule virale et sa décapsidation dans la cellule infectée. La décapsidation est la libération du contenu de la capsule virale suite à l'attaque de la nucléocapside par des enzymes de la cellule infectée.

L'étape de la transcription inverse s'effectue quand à partir de l'ARN viral, un ADN complémentaire est synthétisé par la RT en utilisant comme amorce un ARNt cellulaire. Le brin d'ARN est ensuite dégradé par la RNase H puis un deuxième brin complémentaire d'ADN est synthétisé pour donner un ADN bicaténaire.

L'ADN bicaténaire et l'intégrase passent dans le noyau de la cellule infectée. Cet ADN double brin sera intégré dans le génome cellulaire grâce à l'activité enzymatique de l'intégrase du HIV [Pantaleo G *et al.*, 1993]. C'est l'étape d'intégration.

L'étape de réplication proprement dite commence par la transcription de l'ADN proviral par la cellule infectée en ARN viraux et ARN messagers. Ces ARN seront traduits ensuite en protéines de la capsid, de la membrane et en enzymes.

Les composants des nouveaux virus synthétisés sont rassemblés près de la membrane cellulaire de la cellule infectée. Cela préfigure l'étape de l'assemblage et du bourgeonnement de la membrane cellulaire permettant de libérer des virions (nouveaux virus immatures).

L'étape de maturation permet aux virions de devenir infectieux. La protéase y a une action déterminante car elle permet notamment la formation de la nouvelle nucléocapside. Certaines

protéines comme la p24 de la nucléocapside sont générées par un clivage assuré par la protéase virale, d'un précurseur polypeptidique.

La réplication virale provoque pour la cellule infectée, soit sa lyse suite au bourgeonnement massif de sa membrane cellulaire et donc à la libération des virions, ou soit sa destruction par les cellules du système immunitaire qui la reconnaissent comme un agent étranger lorsqu'elle intègre le HIV.

Remarque :

Le HIV a la capacité de muter facilement à cause principalement d'un taux important d'erreurs induites par la RT (environ une mutation tous les 2000 nucléotides). Ce phénomène entraîne l'émergence de nouveaux variants HIV plus virulents car ils sont plus cytotoxiques, génèrent facilement des syncytiums (fusion de cellules géantes multinucléaires) ou résistent mieux à la chimiothérapie. Différents tissus du corps humain peuvent ainsi présenter différents variants HIV [Fauci AS *et al.*, 1993; Ball JK *et al.*, 1994].

1-1-2-3. Diversité du HIV-1

Le HIV-1 est largement plus répandu que le HIV-2, en effet ce dernier est restreint à l'Afrique de l'Ouest alors que le premier connaît une expansion mondiale [McGrath KM *et al.*, 2001]. Une différence existe au niveau du génome des 2 virus, le gène VPU présent chez le HIV-1 est remplacé par le gène VPX chez le HIV-2 [Henderson LE *et al.*, 1988].

L'analyse phylogénétique du gène POL des lentivirus de primates HIV et SIV (virus de l'immunodéficience simienne), a permis de montrer que les HIV-1 et les SIVcpz (SIV des chimpanzés) étaient proches car formant le groupe 1, tandis que les HIV-2 s'apparentaient aux SIVsm (SIV des Sooty Mangabey) et SIVmac (SIV des macaques) et formaient le groupe 2 [Mcgrath KM *et al.*, 2001].

Les études phylogénétiques des différentes classes des gènes ENV et GAG ont permis de regrouper les différents HIV-1 en 3 grands groupes, M (main), O (outlier) et N (non M et non O) [Robertson DL *et al.*, 2000]. Le groupe N possède pour l'instant un seul isolat viral (YBF30) identifié au Cameroun [Simon F *et al.*, 1998]. Le groupe O comprend aussi un nombre réduit d'isolats viraux répertoriés au Cameroun [Gurtler LG *et al.*, 1996]. Le groupe M est constitué des isolats viraux responsables majoritairement de l'épidémie de l'infection à HIV-1. Il est subdivisé pour l'instant en 9 sous-types, A-D, F-H, J et K. Il existe à l'intérieur des sous-types, des sous-sous-types à l'exemple du HIV-1 A avec A1 et A2, et du HIV-1 F avec F1 et F2 [Robertson DL *et al.*, 2000; Thomson MM *et al.*, 2002].

La diversité du groupe M est importante en raison aussi de l'apparition de sous-types recombinants, ces derniers représentant environ 10% des isolats HIV-1 [Robertson DL *et al.*, 1995]. Les sous-types recombinants impliqués dans l'expansion de l'épidémie de l'infection à HIV-1, sont référencés sous le terme CRF (circulating recombinant forms) soit souches épidémiques recombinantes [Carr JK *et al.*, 1998]. Ils présentent en ce qui concerne le génome viral deux parties de séquences appartenant chacune à des sous-types différents. A l'heure actuelle, il existe 13 CRF dans le monde qui vont de CRF01 AE à CRF14 BG, puisque le CRF09 est exclu (pas de séquence recombinante disponible) [Thomson MM *et al.*, 2002]. Le CRF01 AE a une séquence ENV d'un isolat ancestral E non encore identifié, et il est associé à l'épidémie du HIV-1 en Asie du Sud-Est. La majorité des CRF a une origine africaine mais il en existe 5 qui sont originaires d'autres continents [Robertson DL *et al.*, 2000; Thomson MM *et al.*, 2002]. L'importance des CRF dans la pandémie de l'infection HIV-1 est grandissante, ils représentaient 18% de nouvelles infections en 2000 [Osmanov S *et al.*, 2002].

La distribution géographique des groupes, sous-types, sous-sous-types et CRF de HIV-1 dans le monde (figure 8) laisse déduire que son épïcêtre est localisé en Afrique Centrale

[Thomson MM *et al.*, 2002]. Les isolats viraux y montrent un haut degré de diversité génétique et il y a été retrouvé un isolat HIV-1 du groupe M datant de 1959 [Vidal N *et al.*, 2000; Zhu T *et al.*, 1998].



Figure 8: Distribution géographique des variants HIV-1 circulant dans différentes régions du monde (les variants notés en grands caractères sont prédominants dans la région citée) [Extraite de Thomson MM *et al.*, 2002]

1-1-3. Physiopathologie

Des trois modes de transmission du HIV connus (voies materno-fœtale, sanguine et sexuelle), celui par la voie sexuelle est à l'origine du plus grand nombre d'infections. Le risque de transmission sexuelle dépend de 5 éléments différents, le type de pratiques sexuelles, le nombre de partenaires, le sexe du partenaire infecté, sa contagiosité (phase de l'infection) et la susceptibilité du partenaire non infecté [Chene G, 1999].

Le virus transmis par voie génitale, va s'accrocher aux cellules folliculaires dendritiques. Les particules virales sont ainsi véhiculées vers les ganglions où elles vont infecter d'abord les monocytes/macrophages puis plus tard les lymphocytes T CD4.

Les isolats transmis sont macrophages-tropiques et utilisent le co-récepteur à chémokines CCR5 pour intégrer les macrophages. Avec l'amplification de la réplication virale, il y'a des variants viraux qui sont sélectionnés. Ils présentent un tropisme pour les lymphocytes T CD4 et utilisent le co-récepteur à chémokines CXCR4 pour les envahir. Il existe donc deux types de souches (M-tropiques et T-tropiques) pour deux types de co-récepteurs et des isolats ayant une dualité de tropisme ont été identifiés [Yu XF, 1998]. Ces 3 variants de souches sont représentés dans la figure 9 qui indique leurs caractéristiques biologiques.

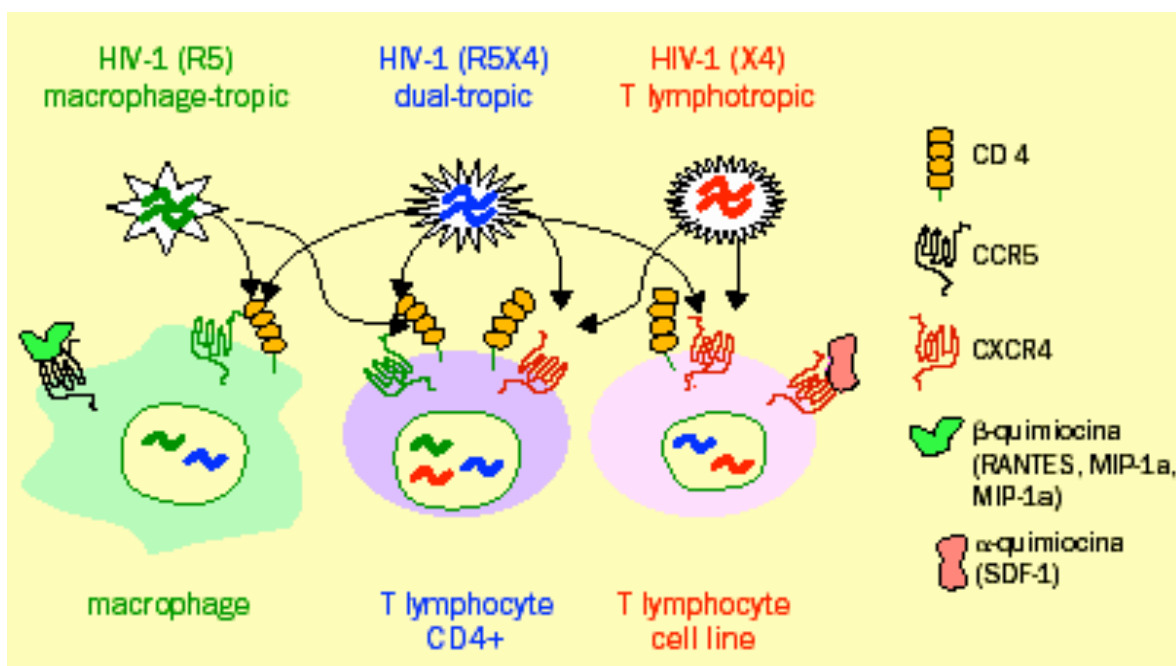


Figure 9: Caractéristiques biologiques des 3 types de souches rencontrées lors de l'infection HIV-1 [Extraite de Thomson MM *et al.*, 2002].

La localisation des co-récepteurs à chémokines, en l'occurrence celle de CCR5 primordiale pour la transmission du HIV, est effective dans plusieurs populations de cellules (monocytes, macrophages, lymphocytes, neurones, astrocytes, cellules microgliales, cellules épithéliales,

cellules endothéliales, fibroblastes). Ces cellules et précisément les phagocytes mononuclées, présentes en nombre élevé dans les zones d'inflammation, facilitent la propagation du HIV vers d'autres sites [Rottman JB *et al.*, 1997].

La pathogenèse de l'infection HIV-1 se décline en 3 phases successives, la primo-infection, les phases asymptomatique et immunodépressive.

1-1-3-1. Phase de primo-infection

C'est la phase d'invasion du virus dans l'organisme humain, elle survient peu après la contamination et présente quelques signes cliniques d'intensités et de durées variables.

Le HIV après avoir atteint en quelques heures les organes lymphoïdes proximaux de la porte d'entrée, va se disséminer dans l'ensemble des organes lymphoïdes. En effet, la présence de particules virales dans les centres germinaux des organes lymphoïdes a été identifiée dès le 5-7^{ème} jour après la contamination [Pantaleo G *et al.*, 1998]. La multiplication des particules virales dans les ganglions, est accompagnée du passage du virus dans la circulation sanguine. Cette phase virémique sanguine est due à l'infection par le HIV des lymphocytes et des monocytes circulants [Chun TW *et al.*, 1998]. Le premier marqueur viral détecté dans la circulation sanguine, est l'ARN viral plasmatique qui apparaît au 12^{ème} jour en moyenne après la contamination. La présence d'antigènes viraux p24 est transitoirement effective entre les 14^{ème} et 21^{ème} jours. L'ADN proviral est détectable dans les cellules mononuclées du sang périphérique à partir du 14-15^{ème} jour [Kaufmann GR *et al.*, 1998].

Très tôt lors de la phase de primo-infection, l'on note l'établissement de particules virales HIV sous forme latente qui infectent certains lymphocytes T CD4 à longue durée de vie, constituant ainsi un réservoir permanent du virus [Chun TW *et al.*, 1998].

La réplication virale est intense pendant la phase de primo-infection et la virémie plasmatique peut atteindre des valeurs supérieures à 1 million de copies par μL , avant de redescendre

spontanément et de se stabiliser en quelques mois [Kaufmann GR *et al.*, 1998; Piatak M *et al.*, 1993].

Pendant la phase de primo-infection, la réponse immune précoce est de deux ordres :

- la réponse cellulaire T CD8

Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques apparaissent dès les premières semaines après la contamination et vont limiter la réplication virale par 2 mécanismes. Le premier est l'effet cytotoxique direct contre les cellules infectées, et le second est l'action indirecte par la libération des facteurs solubles suppressifs (cytokines).

- la réponse humorale T CD4

La réponse de type anticorps par l'intermédiaire des lymphocytes T CD4, est exercée dès les premières semaines de l'infection. Seulement l'apparition des anticorps neutralisants est tardive, et leur effet sur le contrôle de la réplication virale serait faible.

Les manifestations cliniques de la primo-infection surviennent entre 5 et 30 jours après la contamination. Elles sont contemporaines au pic de la réplication virale et régressent en 15 à 30 jours en suivant le cours de la charge virale. Les signes cliniques fréquemment rencontrés sont la fièvre, la fatigue, l'éruption maculopapuleuse, la présence d'adénopathies, la pharyngite, les troubles digestifs, la perte de masse corporelle et les sueurs nocturnes [Schacker T *et al.*, 1996].

Parmi les anomalies biologiques observées, on note une inversion du rapport CD4/CD8 qui devient inférieur à 1 (diminution du nombre de lymphocytes CD4 et ascension du taux des lymphocytes CD8).

Le tableau clinique a une durée d'environ 14 jours et se résout avant la séroconversion. Cette dernière s'établit dès qu'on peut effectuer le dosage des anticorps anti-HIV (6 à 8 semaines en moyenne après la contamination).

Quoi qu'il en soit, la réplication virale n'étant que partiellement combattue, le patient entre dans la deuxième phase de l'infection.

1-1-3-2. Phase asymptomatique

Cette phase est une période de latence clinique très variable, allant de 18 mois à plus de 15 ans. Elle dure 8 à 10 ans en moyenne pendant lesquels le patient ne présente aucun symptôme du SIDA [Fauci AS *et al.*, 1993; Pantaleo G *et al.*, 1993]. La durée de cette phase est inversement proportionnelle à l'âge du sujet au moment où a eu lieu l'infection initial [Rosenberg PS *et al.*, 1994].

La phase asymptomatique est caractérisée par une réplication virale permanente d'un niveau inférieure à celui de la primo-infection, entraînant une lente dégradation des lymphocytes T CD4. Le virus est faiblement détectable au niveau du sang périphérique dans cette phase de latence clinique [Pantaleo G *et al.*, 1993].

Les macrophages et les cellules de Langerhans, en l'occurrence ceux localisés au niveau du tractus génital, servent de réservoirs de virus compte tenu du fait qu'ils sont infectés mais ne sont pas détruits. Ils servent aussi de vecteurs car les cellules de Langerhans des épithéliums permettent au HIV d'infecter d'autres types cellulaires. Les macrophages qui prolifèrent en réponse à d'autres infections (infections mycobactériales par exemple), véhiculent aussi le HIV dans toutes les parties du corps humain [Blauvelt A *et al.*, 1997]. Le virus continue de se répliquer notamment dans les organes lymphoïdes malgré une faible virémie [Pantaleo G *et al.*, 1993].

La destruction par la réplication virale des lymphocytes T CD4 est compensée par la synthèse nouvelle de ces même lymphocytes, c'est le stade d'équilibre [Levy JA *et al.*, 1993]. Pour des raisons non encore totalement élucidées, cet équilibre est rompu au profit d'une réplication virale qui augmente rapidement. Néanmoins l'on sait que le nombre de cellules folliculaires

dendritiques diminue, ainsi la capacité de stimulation des lymphocytes T CD4 régresse et alors l'on assiste à un déclin des cellules CD4 nouvellement synthétisées. La chute rapide considérable des lymphocytes T CD4 entraîne des perturbations profondes de l'immunité amenant le patient en phase immunodépressive. Avant l'apparition de marqueurs sérologiques et immunologiques, c'est le critère de développement de lymphoadénopathie généralisée qui signe le passage de la phase asymptomatique à la phase clinique [Levy JA *et al.*, 1993].

1-1-3-3. Phase immunodépressive

La rupture d'équilibre de la phase asymptomatique est le signe précurseur de la phase immunodépressive, qui laisse le champ libre aux infections opportunistes. Le passage de la phase de latence clinique à la phase de maladie SIDA, peut être évoqué lorsque le taux de lymphocytes CD4 passe en dessous de 500 par μL , alors l'activité des organes lymphoïdes faillit, les antigènes p24 apparaissent dans le sang périphérique et les niveaux d'ARN viraux accroissent [Klatt EC *et al.*, 1998]. La phase immunodépressive est caractérisée par une profonde immunosuppression et une progression de la maladie du SIDA à travers des manifestations de plus en plus graves.

En ce qui concerne le virus, la progression vers la phase clinique est caractérisée par l'apparition de variants HIV SI (induisent les syncytiums) ayant un tropisme pour les cellules CD4. Même s'il a été montré que l'apparition du phénotype SI des variants HIV est un marqueur de progression du SIDA indépendant du taux de lymphocytes CD4 [Saag MS *et al.*, 1994], il n'en demeure pas moins que ce phénotype SI apparaît quand le taux de lymphocytes CD4 du sang périphérique oscille entre 400 et 500 par μL , avant les symptômes du SIDA.

La destruction des cellules de l'hôte s'opère par de nombreux mécanismes notamment les effets viraux directs, la formation de syncytiums, l'action cytotoxique des lymphocytes T CD8, les mécanismes d'auto-immunité, l'action agressive des protéines membranaires viraux

sur la membrane cellulaire, le mécanisme de clearance, l'activation de l'apoptose et l'accumulation toxique des constituants viraux (ARN, protéines) [Fauci AS *et al.*, 1993; Levy JA *et al.*, 1993; Pantaleo G *et al.*, 1993].

L'infection par le HIV est sous-tendue par une continuelle réplication virale avec une infection de nouvelles cellules. Cela s'explique en partie par le fait que la durée de vie des HIV étant seulement de 2 jours, une re-infection de nouveaux lymphocytes T CD4 est requise. Il existe ainsi un rapide "turnover" des HIV et des lymphocytes T CD4 qui promeut l'émergence de nouveaux variants HIV, responsables de résistances aux molécules anti-rétrovirales et de l'échappement au contrôle immunitaire par la variabilité antigénique [Coffin JM *et al.*, 1995; Ho DD *et al.*, 1995].

1-2. FACTEURS GÉNÉTIQUES DE L'HÔTE

Après avoir défini l'infection à HIV sous les angles de la biologie et de la physiopathologie, nous abordons à présent les facteurs pouvant moduler cette infection.

S'il est acquis que la période moyenne menant vers la maladie du SIDA est de 8 à 10 ans, il existe des patients ayant une phase asymptomatique plus longue. Ces patients caractérisés de progresseurs lents sont environ 5% à 10% [Hogan CM *et al.*, 2001]. En outre, il y a des personnes ayant été exposées au risque d'infection à HIV, mais qui demeurent non infectées. Ces individus résistants à l'infection à HIV, se rencontrent dans des populations diverses notamment dans des ménages hétérosexuels et homosexuels, chez les prostitués, chez les utilisateurs de drogues intraveineuses, chez les personnels soignants exposés aux éléments sanguins et chez les enfants nés de mères séropositives HIV.

L'existence de ces deux catégories de personnes montre que les réponses immunes anti-HIV naturelles et adaptatives sont présentes et influencent le devenir de l'infection à HIV. Les facteurs de l'hôte interagissent avec les caractéristiques virales et ces interactions déterminent l'évolution de l'infection à HIV.

Parmi les déterminants viraux influençant la transmission et la progression de l'infection à HIV, quatre types majeurs se dessinent :

- le tropisme des isolats HIV (soit macrophage-tropique ou non SI ; soit T- tropique ou SI), [Scarlati G *et al.*, 1997]
- l'échappement à la réponse immune (certains variants ayant des mutations sur les gènes GAG, POL et ENV, présentent cette caractéristique) [Goulder PJ *et al.*, 1997]
- la non virulence des souches (les isolats présentant un gène NEF inopérant provoquent une progression quasi-nulle de l'infection) [Kirchhoff F *et al.*, 1995]
- la nature des sous-types viraux (selon le sous type, les isolats ont une transmissibilité et une progression de l'infection à HIV différentes) [Kanki PJ *et al.*, 1999].

1-2-1 Différents facteurs de l'hôte

Notre travail concerne certes les facteurs génétiques de l'hôte, mais en dehors de ceux-ci, il existe trois grands types de déterminants de l'hôte.

- L'immunité à médiation cellulaire.

Premièrement, on note la réponse HIV-spécifique T-cytotoxique. Elle permet d'éliminer les particules virales et les cellules infectées par le HIV. Elle joue donc un rôle dans le contrôle initial de la virémie et dans la prévention de l'infection à HIV. En effet, la corrélation temporelle entre une réponse vigoureuse T-cytotoxique et un contrôle initial de la réplication virale du cours de la primo-infection [Koup RA *et al.*, 1994], la présence disproportionnée de cette même réponse T-cytotoxique active chez les progresseurs lents comparés aux progresseurs rapides [Hay CM *et al.*, 1999], et l'évidente présence de cette réponse chez les sujets exposés mais non infectés [Rowland-Jones S *et al.*, 1995; Pinto LA *et al.*, 1995], attestent du rôle crucial des lymphocytes T CD8 cytotoxiques.

Secondairement il y'a la réponse médiée par les lymphocytes T CD4 helper qui permet de préserver l'action des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Les cellules présentatrices d'antigènes vont présenter un épitope viral à l'aide du système HLA II, aux récepteurs des lymphocytes T CD4 helper. Ensuite par l'intermédiaire de l'interleukine-2, les lymphocytes T CD4 helper activés vont agir sur les lymphocytes T CD8 qui vont maintenir leur action cytotoxique. L'importance de la réponse T CD4 helper est mise en relief par des études impliquant l'administration exogène de cytokines pour suppléer l'absence de cette réponse T CD4 [Dybul M *et al.*, 2000], et par des travaux de recherches chez les progresseurs lents montrant l'activité élevée de cette même réponse [Rosenberg ES, 1997]. La perte de la fonction HIV-spécifique T CD4 helper a été démontrée durant la primo-infection [Musey LK *et al.*, 1999].

- L'immunité à médiation humorale

Son rôle dans la transmission et la progression de l'infection à HIV, n'est pas pleinement établie. En effet, même si les particules virales et les cellules infectées par le HIV peuvent activer la formation d'anticorps neutralisants [Haigwood NL *et al.*, 1998], ces derniers retrouvés chez les patients infectés par le HIV, ne présentent pas toujours de taux corrélés avec la progression de la maladie [Montefiori DC *et al.*, 1996; Lifson AR *et al.*, 1991]. En plus chez les sujets exposés mais non infectés, les anticorps neutralisants n'ont pas été retrouvés. D'autres types d'anticorps sont impliqués dans l'infection à HIV. Ce sont les anticorps utilisant le système du complément dont la résistance contre l'infection HIV a été montrée [Sullivan BL *et al.*, 1996]. Mais aussi les anticorps médiant la cytolysse cellulaire et qui sont corrélés à une protection contre l'infection à HIV [Hildreth JE *et al.*, 1999].

- Les facteurs locaux

Plusieurs types de facteurs locaux sont évoqués.

Il y'a les cellules dendritiques qui joueraient un rôle important dans l'infection initiale des muqueuses (transmission par la voie sexuelle). Précisément elles facilitent l'infection des lymphocytes T en capturant et en transportant les particules virales dans les ganglions et au contact des cellules T [Cameron PU *et al.*, 1992; Geijtenbeek TB *et al.*, 2000].

La présence concomitante des maladies sexuellement transmissibles au moment de l'infection est aussi un facteur local. Elle est associée à un risque accru de transmission et de progression de la maladie, dû en majeure partie à l'inflammation, l'ulcération et l'altération des barrières physiques [Plummer FA *et al.*, 1998].

Parmi les facteurs locaux, on compte aussi la circoncision, la contraception, la menstruation et les sécrétions génitales [Hogan CM *et al.*, 2001]. Les muqueuses par la présence d'anticorps IgA en leur sein, paraissent impliquées dans la résistance à l'infection HIV [Kaul R *et al.*, 1999], mais le rôle de ces anticorps demeure imprécis.

Les facteurs génétiques, évoqués dans l'infection à HIV, peuvent se regrouper en deux grands groupes :

- 1- Les déterminants génétiques des molécules impliquées dans le processus d'entrée du HIV dans la cellule-cible.

Il s'agit ici de modifier l'action des co-récepteurs CCR5 et CXCR4 permettant ainsi de perturber la fixation du HIV. Deux axes d'orientations sont observés, soit l'action indirecte par les ligands naturels de ces co-récepteurs, c'est-à-dire les chémokines, soit alors l'action directe sur les co-récepteurs. S'il est acquis l'utilisation des corécepteurs CCR5 et CXCR4 respectivement par les isolats M et T-tropiques, il demeure aussi que d'autres co-récepteurs peuvent être employés, CCR2, CCR3, CCR8, CCR9, STRL33, Gpr 15, Gpr 1, ChemR23 et APJ [Deng HK *et al.*, 1997].

- 2- Les variants génétiques des composantes du système immunitaire.

On note les variants des molécules de la réponse adaptative à l'exemple des allèles du système HLA, et ceux de la réponse non spécifique comme les variants génétiques de la protéine liant le mannose (MBL), des cytokines (Interleukine-10, TNF α) et de la protéine de macrophage NRAMP-1 (natural receptor macrophage protein type-1).

1-2-2 Chémokines

Les chémokines sont des cytokines particulières ayant un poids moléculaire relativement faible (inférieur à 10 kD). Les deux premiers résidus cystéine soit adjacents (β -chémokine ou chémokine CC) soit séparés par un acide aminé quelconque (α -chémokine ou chémokine CXC), permettent d'identifier deux sous-groupes de molécules dont les gènes sont localisés respectivement sur les chromosomes 17 et 4.

En 1995, Cocchi *et al.* identifient des molécules sécrétées par les cellules CD8 et influençant la capacité du HIV à infecter les cellules, ce sont les β -chémokines RANTES

(regulated on activation normal T expressed and secreted), MIP-1 α (macrophage inflammatory proteine-1 α) et MIP-1 β [Cocchi F *et al.*, 1995]. Ces trois β -chémokines sont les ligands majeurs du récepteur CCR5 qui est requis pour l'entrée des souches HIV macrophages-tropiques. Ainsi ces chémokines peuvent bloquer l'entrée des isolats HIV M-tropiques par compétition. Cela est confirmé par la présence de taux élevés de ces chémokines corrélés à une suppression de la réplication virale des souches M-tropiques de HIV chez les personnes exposées mais non infectées [Paxton WA *et al.*, 1996]. A l'inverse des études montrant l'influence des chémokines, il en est d'autres qui ne la retrouvent pas [Mazzoli S *et al.*, 1997]. Néanmoins les études *in-vitro* suggèrent que les molécules RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β régulent la réplication du HIV dans les macrophages et les monocytes en recrutant les cibles CCR5 (voir figure 10) [Schmidtayerova H *et al.*, 1996].

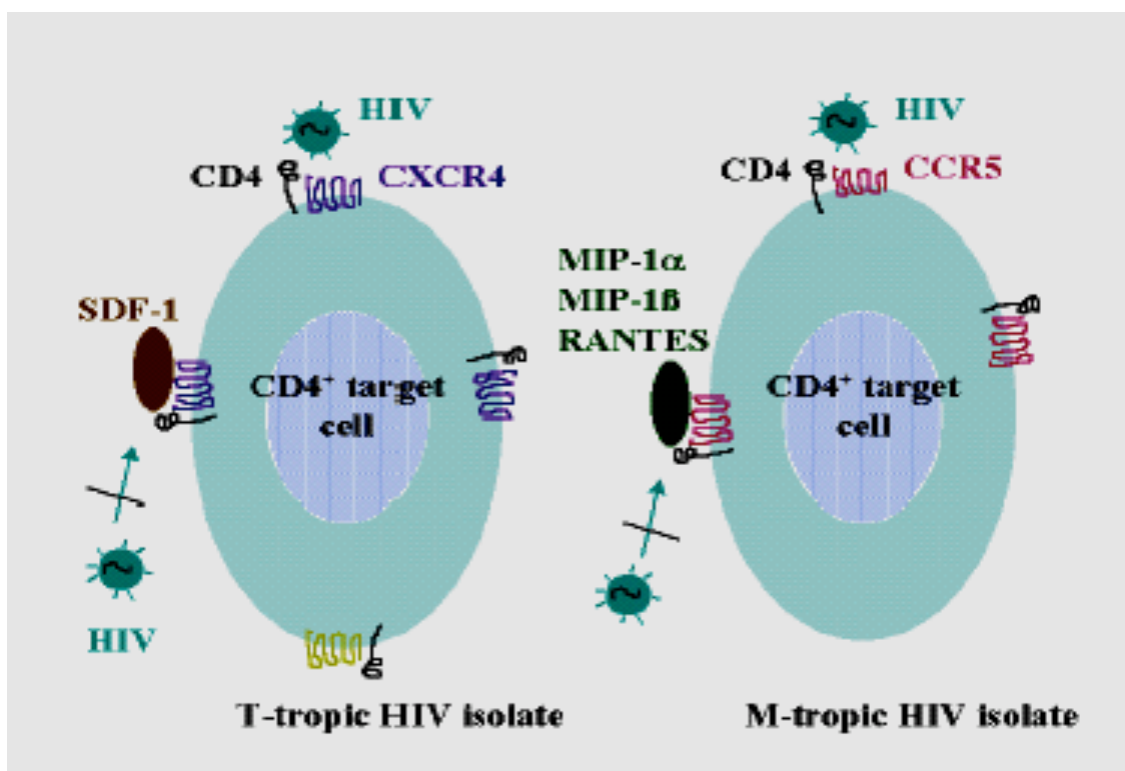


Figure 10: Inhibition de l'entrée des isolats HIV T- et M-tropiques par les chémokines [Extraite de Rubbert A *et al.*, 2003]

L'un des arguments en faveur de l'effet modulateur de ces chémokines sur la transmission et la progression de l'infection à HIV, est la découverte de polymorphismes du gène RANTES associés à la résistance ou la susceptibilité à l'infection à HIV. Trois polymorphismes, deux dans la région promotrice du gène RANTES (-28C/G et -403G/A) et un dans le premier intron (In1.1 T/C), sont identifiés comme éléments régulateurs de la transcription de RANTES [Liu H *et al.*, 1999; An P *et al.*, 2002].

L'haplotype A₋₄₀₃G₋₂₈ a été associé à la résistance contre la progression de l'infection HIV dans la population japonaise [Liu H *et al.*, 1999]. Dans la population caucasienne américaine, le génotype A₋₄₀₃C₋₂₈ est lui associé à la susceptibilité à l'infection HIV [Gonzalez E *et al.*, 2001]. Les différents génotypes RANTES montrent une hétérogénéité dans leur influence sur l'infection HIV car l'haplotype A₋₄₀₃C₋₂₈ est retrouvé à la fois susceptible à la transmission du HIV et résistant à la progression de cette même infection [McDermott D *et al.*, 2000]. Dans une autre étude concernant des Afro-américains, aucune association entre ces deux polymorphismes et l'infection HIV n'est retrouvée [Gonzalez E *et al.*, 2001]. Le troisième polymorphisme In1.1 T/C illustre un effet dominant avec un risque évalué à 37% pour la progression de l'infection HIV dans la population Afro-américaine [An P *et al.*, 2002].

Concernant la β -chémokine MIP-1 α , deux polymorphismes du gène (+113C/T et +459C/T) ont été associés différemment avec l'infection HIV selon la nature des populations. Chez les Caucasiens américains, le génotype homozygote C₊₁₁₃T₊₄₅₉ a été associé à une progression accélérée de l'infection HIV, et aucune association n'a été retrouvée concernant la transmission de cette infection. Par contre chez les Afro-américains, l'haplotype T₊₁₁₃T₊₄₅₉ est associé à un faible risque de transmission de l'infection HIV, et aucune association n'est identifiée concernant la progression de l'infection [Gonzalez E *et al.*, 2001].

Les souches HIV M-tropiques peuvent utiliser pour entrer dans les cellules cibles d'autres co-récepteurs que CCR5 à l'exemple de CCR2b ou CCR3. Les chémokines ligands de ces

récepteurs sont MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) à MCP-5 pour CCR2b, et MCP-3, MCP-4, Eotaxin 1 et 2 pour CCR3 [Luster AD *et al.*, 1998]. L'implication de ces chémokines dans la pathogenèse de l'infection HIV est évoquée notamment par la découverte de polymorphismes dans leurs gènes associés à l'infection. Le génotype homozygote de l'allèle MCP-1-2578G est associé dans une étude chez les adultes non infectés à une réduction de 50% du risque de transmission du HIV-1, et dans le même temps à une progression accrue de la maladie chez les sujets infectés [Gonzalez E *et al.*, 2002].

Le deuxième groupe de chémokines (α -chémokines) est aussi impliqué dans la pathogenèse de l'infection HIV. Certaines α -chémokines sont ligands des récepteurs CXCR4 utilisés par les isolats HIV T-tropiques.

La molécule SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) est l'alpha-chémokine ligand naturel majeur des récepteurs CXCR4. Elle peut contribuer à l'inhibition de la réplication virale HIV soit en interférant la liaison du virus avec le récepteur CXCR4, soit en régulant le nombre de récepteurs présents [Amara A *et al.*, 1997]. L'inhibition de l'infection HIV-1 utilisant les souches T-tropiques par l'alpha-chémokine SDF-1, a été mise en évidence en 1996 dans deux études [Bleul CC *et al.*, 1996; Oberlin E *et al.*, 1996].

L'influence d'un polymorphisme du gène SDF-1 situé en région 3' non codante (polymorphisme peut-être impliqué dans la régulation de la synthèse de la protéine SDF-1 et par conséquent pouvant inhiber la liaison des souches HIV T-tropiques par compétition) a fait l'objet de plusieurs études parfois contradictoires. C'est ainsi que certaines études ont montré que des sujets homozygotes pour cette mutation SDF-1 3' α présentaient une progression faible de l'infection HIV vers la maladie SIDA [Martin MP *et al.*, 1998]. Tandis que d'autres études associaient l'allèle SDF-1 3' α à l'état homozygote à une progression accrue vers la maladie SIDA [Mummidi S *et al.*, 1998; Brambilla A *et al.*, 2000]. Cette hétérogénéité de résultats rend l'impact de ce polymorphisme peu clair vis-à-vis de l'infection HIV.

1-2-3. Récepteurs à chémokines

Deux groupes de récepteurs à chémokines sont répartis en fonction du type de chémokines qui s'y lie. Pour les β -chémokines, on a les récepteurs CC, et pour les α -chémokines, les récepteurs CXC. Tous ces récepteurs à chémokines appartiennent à une famille de récepteurs à 7 domaines trans-membranaires [Murphy PM *et al.*, 1996]. La nécessaire présence des co-récepteurs à chémokines pour l'entrée du HIV dans les cellules cibles, en fait un facteur génétique de l'hôte pouvant affecter la transmission et la progression de l'infection HIV. Ce facteur génétique est pour les isolats HIV M-tropiques le récepteur CCR5 et accessoirement les récepteurs CCR2b et CCR3, et pour les isolats T-tropiques le récepteur CXCR4 [Deng H *et al.*, 1996; Dragic T *et al.*, 1996; Doranz BJ *et al.*, 1996]. Passons donc en revue ces différents récepteurs en commençant par celui utilisé par les souches HIV T-tropiques.

1-2-3-1. Récepteurs CXCR4

Ces récepteurs sont donc utilisés par les souches HIV T-tropiques lesquelles sont présentes majoritairement lors de la progression vers la maladie SIDA. Pendant la phase asymptomatique, les isolats HIV utilisent les récepteurs CCR5, avant d'en perdre progressivement l'usage dès le début de la phase symptomatique au profit des récepteurs CXCR4, et quelquefois CCR3 dans certains cas [Scarlati G *et al.*, 1997]. Le gène du récepteur CXCR4 est connu jusqu'à l'heure actuelle, comme non polymorphe, les seuls variants génétiques observés sont en réalité liés à la chémokine ligand SDF-1.

1-2-3-2. Récepteurs CCR5

L'importance du récepteur CCR5 dans l'infection HIV (transmission et progression) a été mise en évidence en 1996 par trois équipes indépendantes de recherches. Elles avaient montré que des sujets porteurs de la mutation $\Delta 32$ du gène CCR5 présentaient une résistance à la transmission et à la progression de l'infection HIV [Samson M *et al.*, 1996; Dean M *et al.*, 1996; Liu R *et al.*, 1996].

Cette mutation est une délétion de 32bp due à la présence prématurée d'un codon stop. Cette délétion génère alors une protéine tronquée ne permettant pas la fixation des souches HIV M-tropiques sur les cellules-cibles. Cette mutation délétère commence au niveau de la région codant pour la troisième boucle extracellulaire et s'étend jusqu'au cinquième domaine transmembranaire, résultant finalement d'une protéine non exprimée à la surface cellulaire [Liu R *et al.*, 1996]. Cet allèle mutant CCR5- $\Delta 32$ est présente dans la population caucasienne (9,1% en moyenne de fréquence allélique) avec en Europe un gradient croissant allant du Sud vers le Nord [Lucotte G *et al.*, 1998]. Dans la population africaine, cet allèle CCR5- $\Delta 32$ est inexistant. Il possède une fréquence faible au Moyen Orient et dans le sous continent Indien, et encore plus faible en Asie [Martinson JJ *et al.*, 1997].

A l'état homozygote, cet allèle mutant CCR5- $\Delta 32$ permet d'opposer une résistance à la transmission de l'infection HIV dans la quasi-totalité des études [Roger M, 1998; Hogan CM *et al.*, 2001]. Néanmoins, quelques cas de patients HIV homozygotes pour la mutation CCR5- $\Delta 32$ sont recensés, ils présentent en majorité des souches HIV pouvant utiliser en outre les récepteurs CXCR4 [Theodorou I *et al.*, 1997; O'Brien TR *et al.*, 1997]. Concernant les sujets hétérozygotes pour l'allèle CCR5- $\Delta 32$, la majorité des études s'accorde à montrer une association avec une progression ralentie de l'infection HIV [Michael NL *et al.*, 1997; Zimmerman PA *et al.*, 1997; Eugen-Olsen J *et al.*, 1997]. Cette résistance s'exprime par une durée de 2 à 4 ans de progression réfrénée [Dean M *et al.*, 1996] ou par une progression

ralentie de manière significative pendant les 7 premières années de SIDA dans certaines études [Huang Y *et al.*, 1996; Meyer L *et al.*, 1997] ou au-delà de 12 ans de SIDA dans d'autres [Michael NL *et al.*, 1997; Zimmerman PA *et al.*, 1997].

L'influence de l'allèle CCR5-Δ32 chez les patients hétérozygotes est perçue par l'intermédiaire d'un déclin peu accentué du taux de lymphocytes T CD4 et d'une charge virale faible après la séroconversion [Huang Y *et al.*, 1996]. En dehors de cela, l'allèle CCR5-Δ32 à l'état hétérozygote est associé à une susceptibilité réduite à la toxoplasmose [Meyer L *et al.*, 1999] et au lymphome des cellules B [Rabkin CS *et al.*, 1999], mais encore permet une meilleure réponse à la thérapie antivirale [Valdez H *et al.*, 1999].

L'importance du récepteur CCR5 confirmée, le variant génétique CCR5-Δ32 éprouvé, d'autres mutations dans la région codante du gène CCR5 ont été identifiées mais sans aucun impact fonctionnel avéré. Ces mutations en nombre supérieur à 16, sont pour la plupart rares et 3 d'entre elles sont isosémantiques [Carrington M *et al.*, 1997]. L'allèle CCR5-Δ32 demeure l'allèle majeur du gène CCR5 même si une autre mutation très rare à la position nt303 entraînerait aussi une absence d'expression de la molécule CCR5 chez les sujets hétérozygotes composite (CCR5 Δ32/m303) [Quillent C *et al.*, 1998]. Cette mutation m-303 est une substitution T→A introduisant un codon stop prématuré, elle est identifiée dans la population caucasienne.

1-2-3-3. Région promotrice du gène CCR5

Eu égard à l'importance du récepteur CCR5, des polymorphismes dans la région promotrice dudit gène ont été décrits. Ils pourraient en agissant sur l'aspect quantitatif de la molécule, la réguler et donc moduler l'infection par les souches HIV M-tropiques [Mummidi S *et al.*, 1997].

Deux régions promotrices distinctes P_D (promoteur proximal, région proche du gène) et P_U (promoteur distal, région éloignée) abritent ces polymorphismes. Pas moins de 12 polymorphismes ont été identifiés notamment dans la région P_D, laquelle inclue les exons 2 et 3 du gène CCR5 [Mummidi S *et al.*, 1997; Martin MP *et al.*, 1998; Kostrikis LG *et al.*, 1998]. Une étude d'association a montré en 1998, que des patients HIV homozygotes pour l'allèle CCR5-59029G, progressent plus lentement vers le SIDA en comparaison aux patients HIV homozygotes pour l'allèle CCR5-59029A [McDermott DH *et al.*, 1998]. Dans le même temps, une autre étude de 4 cohortes de patients HIV a permis d'établir un haplotype avec 4 allèles communs (P1 à P4) parmi 10, résultant d'une combinaison spécifique de 10 mutations des séquences régulatrices du gène CCR5 [Martin MP *et al.*, 1998]. Les résultats de cette étude montrent une association entre l'haplotype CCR5-P1 (G₅₈₉₃₄-A₅₉₃₃₈-C₅₉₃₅₂-C₅₉₃₅₃-C₅₉₃₅₆-C₅₉₃₇₃-A₅₉₄₀₂-T₅₉₄₁₀-C₅₉₄₄₀-G₅₉₅₃₇) à l'état homozygote et une progression accélérée vers la maladie SIDA, particulièrement lors des premières années après l'infection. Un autre allèle de la région promotrice CCR5-59353C à l'état homozygote, a été associé à un déclin ralenti du taux de cellules CD4 chez les patients HIV [Easterbrook PJ *et al.*, 1999]. Une étude réalisée en Australie, montre que les patients HIV homozygotes pour les 2 allèles à la fois CCR5-59029A et CCR5-59353C sont sous-représentés dans le groupe de progresseurs lents. Elle suggère un caractère aggravant le SIDA pour ces deux allèles ayant un fort déséquilibre de liaison [Clegg AO *et al.*, 2000]. Enfin l'allèle CCR5-59356T, prévalent dans la population afro-américaine, a été associé à l'état homozygote à une transmission materno-fœtale élevée chez les nouveaux-nés afro-américains [Kostrikis LG *et al.*, 1999]. Ce même allèle CCR5-59356T étudié dans une population de femmes séropositives HIV au Kenya, montre que les femmes hétérozygotes CCR5-59356T présentent un risque trois fois plus important de décéder durant les deux premières années de la maladie SIDA [John GC *et al.*, 2001].

Les résultats associant les polymorphismes de la région promotrice du gène CCR5 à la résistance/susceptibilité à l'infection HIV, affichent quelques conclusions contradictoires. En outre le riche spectre des haplotypes CCR5 dans différentes populations entraîne des impacts différents en l'occurrence entre les Caucasiens et les Afro-américains [Gonzalez E *et al.*, 1999]. Tenant compte de ces deux faits, les études des polymorphismes des séquences régulatrices du gène CCR5 sont requises surtout dans la population africaine très peu analysée.

1-2-3-4. Récepteurs accessoires CCR2b et CX3CR1

Les variants génétiques des récepteurs susceptibles d'être utilisés par les isolats HIV pour intégrer les cellules cibles, ont aussi été analysés. L'exploration du gène CCR2b révèle une mutation en position 190G→A, entraînant un changement d'acide aminé en position 64 de valine en isoleucine au niveau du premier domaine trans-membranaire de la molécule [Smith MW *et al.*, 1997]. Ce variant CCR2b-V64I relativement commun (fréquence allélique d'environ 10% chez les Caucasiens, 15% chez les Afro-américains, 17% chez les Hispaniques et 25% chez les Asiatiques) présente un taux d'expression normal de la protéine CCR2b [Hogan CM *et al.*, 2001].

L'allèle CCR2b-V64I, non associé à la transmission du HIV, est plutôt présenté comme un facteur de la progression de l'infection HIV. En effet une association a été retrouvée entre l'allèle CCR2b-V64I et une progression différée de 2 à 4 ans de l'infection HIV-1 dans une population américaine de 3003 patients [Smith MW *et al.*, 1997]. Dans la même année et quelques mois plus tard, les analyses de Michael NL *et al.* ne confirment pas cette association dans une autre population de patients HIV américains [Michael NL *et al.*, 1997]. Par contre une autre étude de patients HIV de Chicago (Etats-Unis) permet de lier l'allèle CCR2b-V64I à

l'état hétérozygote et une charge virale faible 9 à 12 mois après la séroconversion [Kostrikis LG *et al.*, 1998].

Les mécanismes de l'éventuelle protection de l'allèle CCR2b-V64I contre la progression de l'infection HIV ont aussi été évoqués. Le polymorphisme CCR2b-V64I s'est révélé sans effet sur le taux sérique et la fonction de la protéine CCR2b [Lee B *et al.*, 1998]. Pour ce variant génétique d'un récepteur rarement utilisé, *in vitro* en tout cas par le HIV-1, un déséquilibre de liaison avec un polymorphisme du gène CCR5 a été recherché compte tenu de la proximité des deux gènes. Aucun déséquilibre de liaison avec l'allèle protecteur CCR5-Δ32 n'a été retrouvé [Smith MW *et al.*, 1997; Kostrikis LG *et al.*, 1998]. Par contre un polymorphisme dans la région promotrice (CCR5-59653T) a été retrouvé en déséquilibre de liaison avec l'allèle CCR2b-V64I, mais sans aucune signification fonctionnelle avérée [Kostrikis LG *et al.*, 1998].

Bien qu'étant un allèle commun à tous les types de populations, CCR2b-V64I a été analysé comme ayant un effet ralentissant l'infection HIV-1 chez les Afro-américains mais pas dans la population caucasienne [Mummidi S *et al.*, 1998]. Les études au sujet de l'impact du variant CCR2b-V64I dans la course de l'infection HIV présentent quelques dissonances [Michael NL *et al.*, 1997; Eugen-Olsen J *et al.*, 1998; Schinkel J *et al.*, 1999]. On enregistre aussi des lacunes en termes de profils génétiques et d'études d'associations dans d'autres populations telles que les populations sub-sahariennes. En outre, le mécanisme d'action de la résistance contre la progression de l'infection HIV conférée par l'allèle CCR2b-V64I, reste complètement à élucider.

Le récepteur CX3CR1 dont le ligand est la chémokine fractalkine, à été récemment décrit comme un des co-récepteurs pour l'infection par le HIV-1, particulièrement exprimé au niveau du cerveau [Rucker J *et al.*, 1997; Combadiere C *et al.*, 1998]. Des variants génétiques de ce co-récepteur évalué comme un gène candidat, ont été ainsi recherchés. Des cinq

polymorphismes identifiés, deux entraînent un changement d'acides aminés, valine en isoleucine à la position 249 (V249I), et thréonine en méthionine en position 280 (T280M) [Faure S *et al.*, 2000]. Ces deux mutations V249I et T280M ont une fréquence respectivement de 26% et 13% dans la population caucasienne [Faure S *et al.*, 2000]. L'analyse de trois cohortes françaises et américaine de patients HIV a permis de déceler une association entre l'haplotype I₂₄₉-M₂₈₀ du gène CX3CR1 (à l'état homozygote) et une accélération de la progression de l'infection HIV vers le SIDA [Faure S *et al.*, 2000]. Une autre étude de 3 cohortes américaines de patients HIV n'a pas retrouvé cette association [McDermott DH *et al.*, 2000], mettant en évidence le besoin d'éclaircir le rôle des variants CX3CR1 dans la pathogenèse de l'infection HIV.

1-2-4. Protéine liant le mannose (MBL)

La MBL (mannose-binding lectin) est une protéine de la famille des collectines, synthétisée principalement par le foie, et impliquée dans la réponse immune non spécifique contre divers agents infectieux, bien avant l'établissement de l'immunité adaptative [Turner MW *et al.*, 1996].

L'étude du gène MBL (10q11.2) a permis de découvrir trois mutations dans le premier de ses quatre exons et trois polymorphismes prépondérants dans la région promotrice proximale. Les trois mutations dans l'exon 1 ont été découvertes dans cet ordre chronologique:

- G54D (G→A en position 230) avec un remplacement de la glycine par l'acide aspartique au niveau de la protéine, elle est aussi appelée allèle B [Sumiya M *et al.*, 1991].
- G57E (G→A en position 239) avec une substitution de la glycine par l'acide glutamique au niveau de la séquence protéinique, elle est aussi dénommée allèle C [Lipscombe RJ *et al.*, 1992].

- R52C (C→T en position 223) avec un remplacement de l'arginine par la cystéine au niveau de la protéine, elle est aussi appelée allèle D [Madsen HO *et al.*, 1995].

Les deux premiers polymorphismes de la région promotrice ont été découverts aux positions -550G→C (allèles H et L) et -221G→C (allèles Y et X). Seulement trois haplotypes sur les quatre possibles ont été retrouvés et associés à un taux sérique de MBL différent, HY = taux élevé de MBL, LY = taux moyen et LX = taux faible [Madsen HO *et al.*, 1995]. Le troisième polymorphisme est situé en région 5' non transcrite et en position +4C→T (allèles P et Q) [Madsen HO *et al.*, 1998]. Les polymorphismes contenus dans l'exon 1 (allèles A, B, C et D) définissent des allèles majeurs en comparaison aux polymorphismes de la région promotrice.

La protéine MBL est constituée de 2, 3, 4 ou 6 sous-unités identiques de 96kDa qui sont liées par des ponts bisulfures dans leur région NH₂-terminale. Chaque sous-unité résulte de l'association de trois brins identiques de 32kDa chacun et comporte quatre parties, région NH₂-terminale riche en cystéine, région collagène-like (triple hélice), région de jonction (hélice alpha) et domaine de reconnaissance des carbohydrates CRD (3 structures globulaires). [Turner MW *et al.*, 2000].

L'une des fonctions de la MBL est l'activation de la voie classique du complément soit directement en se substituant au C1q, soit indirectement en se complexant avec la protéase MASP (MBL-associated serine protease) [Matsushita M *et al.*, 1992]. L'autre fonction consiste à ce qu'elle agisse directement comme une opsonine en se fixant à la surface d'agents pathogènes dont elle stimule la phagocytose par les macrophages sériques. En présence de calcium et grâce à ses domaines CRD, la MBL reconnaît spécifiquement les sucres des particules virales, bactériennes, parasitaires ou fongiques riches en N-acétyl-glucosamine, mannose ou fucose [Kuhlman M *et al.*, 1989].

Le défaut quantitatif de la protéine MBL, a été corrélé avec une opsonisation défectueuse et une altération du mécanisme de phagocytose [Super M *et al.*, 1989; Garred P *et al.*, 1995].

C'est ainsi que des associations ont été retrouvées entre le taux sérique de la protéine, les variants génétiques MBL et diverses infections (maladies infectieuses et maladies auto-immunes) [Turner MW *et al.*, 2000].

Pour permettre l'opsonisation, la MBL peut donc se fixer aux résidus mannose présents à la surface d'agents viraux, tels que les glycoprotéines de l'enveloppe du HIV [Kuhlman M *et al.*, 1989]. Les études *in vitro* ont montré que la MBL reconnaissait les résidus mannose de la glycoprotéine gp120, qui est impliquée dans le processus de fixation et d'entrée du HIV [Ezekowitz RA *et al.*, 1989]. La MBL pouvant donc inhiber l'entrée des virus dans les cellules cibles, cela motivait la mise en place d'études de la relation MBL-susceptibilité à l'infection HIV. Une étude d'association effectuée dans une cohorte de patients HIV homosexuels danois, montre alors un lien entre les allèles variants MBL à l'état homozygote et une susceptibilité accrue à l'infection HIV [Garred P *et al.*, 1997]. Concernant la maladie SIDA, Garred *et al.* établit aussi une association avec un temps court de survie une fois le diagnostic du SIDA posé. Dans une cohorte de patients séropositifs HIV finlandais, une sur-représentation des sujets homozygotes pour les allèles variants comparativement à une population témoin, est observée [Pastinen T *et al.*, 1998]. En même temps, l'étude d'une cohorte de patients HIV-1 hollandais fait apparaître une association entre les allèles variants et la progression lente de l'infection HIV vers le SIDA, et aucune association avec le temps de survie après le diagnostic du SIDA [Maas J *et al.*, 1998].

En dehors des contradictions apparentes entre toutes ces études, le fait majeur est l'absence d'études d'associations dans la population africaine sub-saharienne. En plus dans cette population africaine, l'allèle prévalent est MBL-G57E alors que dans la population caucasienne c'est plutôt MBL-G54D [Lipscombe RJ *et al.*, 1992].

1-2-5. Gènes régulant la fonction immune

Parmi les gènes régulant la fonction immune, figurent ceux du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cet ensemble de gènes situés sur le chromosome 6 comprend les allèles des classes I (A, B, C, E, F et G) et II (DM, DP, DQ et DR) du HLA et les gènes codant pour le transporteur TAP (transporter for antigen processing) et les gènes TNF- α et - β . Les variants de ces différents gènes ont été étudiés en relation avec la progression de l'infection HIV [Carrington M *et al.*, 2001]. Le tableau 4 suivant recense la majeure partie des études montrant des associations entre les variants génétiques du complexe CMH et la progression de l'infection HIV [Roger M, 1998].

Population	Nbre (>60)	Groupe à risque	Variants génétiques	Progression	Références
Italiens	76	Hémophiles	HLA DR3-DQ2	Rapide	Fabio G, 1990, Br J Hematol
Européens	180	Pop. générale	HLA A1-B8-DR3, B21, B35	Rapide	Kaplan C, 1990, Hum Hered
			HLA DR1, DR4	Lente	
Américains	98	Homosexuels	HLA DRB1*0101-DQA1*0101	Rapide	Louie LE, 1991, JAIDS
			HLA DRB1*1401-DQA1*0101	Rapide	
			HLA DRB1*0702-DQA1*0201	Lente	
Australiens	65	Hémophiles	HLA DR3, DR5/ HLA DR4	Rapide/ Lente	Donald JA, 1992, Tissue Antigens
Français	144	Hémophiles	HLA B35	Rapide	Sahmound T, 1993, AIDS
Néerlandais	106	Homosexuels	HLA B35	Rapide	Klein MR, 1994, JID
Ecossais	133	Drogés	HLA A1-B8-DR3/ HLA B27	Rapide/ Lente	McNeil AJ, 1996, Q J Med
Américains	81	Enfants	HLA DQB1*0201	Rapide	Just JJ, 1996, Tissue Antigens
Américains	381	Homosexuels	HLA A24-TAP2.1	Rapide	Kaslow RA, 1996, Nat Med
			HLA A3-TAP1.2/ HLA B8-TAP2.1		
			HLA B60-TAP2.1/ HLA A23, A26, B38		
			HLA DRB1*1400-DQB*0503		
			HLA A32-TAP2.3	Lente	
			HLA B27, B57		
			HLA DRB1*1300-DQB*0603-TAP2.3		
			HLA DRB1*0700-DQB*0303-TAP2.3		
			HLA DRB1*0801-DQB*0400		

Tableau 4 : Associations entre les variants des gènes du CMH et la progression de l'infection HIV-1 [Extrait de Roger M *et al.*, 1998]

Enormément d'allèles du système HLA sont associés à une évolution rapide ou lente de l'infection HIV, l'hypothèse émise pour l'expliquer est la sélection avantageuse des hétérozygotes. En effet, les individus hétérozygotes pour les allèles HLA, sont capables de présenter une grande variété de peptides antigéniques, entraînant une réponse plus efficace à un large répertoire d'agents pathogènes [Doherty PC *et al.*, 1975]. En confirmation, une large étude concernant 498 patients HIV-1 a montré que les sujets hétérozygotes pour les allèles HLA de classe I, présentaient une progression ralentie du SIDA [Carrington M *et al.*, 1999]. Une autre étude publiée la même année, montre que les génotypes HLA-A et HLA-B à l'état homozygote se retrouvent en fréquences significativement élevées chez les patients HIV progressant rapidement vers les stades finaux du SIDA [Tang J *et al.*, 1999]. En outre, cette dernière étude est l'une des rares à concerner en partie des patients HIV de l'Afrique Noire. Elle met d'ailleurs en évidence des associations différentes selon la nature de la population. En effet chez les Caucasiens européens (Pays-Bas), les patients HIV homozygotes pour l'allèle HLA-B progressent rapidement vers les derniers stades du SIDA, alors que dans la population sub-saharienne, ce sont les patients HIV homozygotes pour l'allèle HLA-A qui sont concernés [Tang J *et al.*, 1999]. Cette différence en ce qui concerne la nature de l'allèle HLA mis en cause, rend indispensables dans ce champ les études chez les sujets d'Afrique Noire.

Les perturbations du taux sérique des cytokines inflammatoires et leur activité, sont décrites lors de la pathogenèse de l'infection HIV, et elles contribuent au dérèglement du système immunitaire [Ensoli B *et al.*, 1989]. Ce sont les cellules inflammatoires (les lymphocytes et les macrophages entre autres) qui produisent les cytokines telles que les interleukines 4, 6 et 10 (IL-4, -6 et -10) et les TNF- α et β , retrouvés chez les patients HIV [Dezube BJ *et al.*, 1992].

La cytokine TH₂ IL-4 possède plusieurs fonctions modulant la réponse immunitaire, dont la capacité à induire la production d'immunoglobuline E, l'inhibition des récepteurs CCR5 et la stimulation des récepteurs CXCR4 [Valentin A *et al.*, 1998; Wang J *et al.*, 1998]. Un polymorphisme dans la région promotrice du gène IL-4, -589C→T, à l'état homozygote, a été associé dans une étude au Japon à un taux élevé d'isolats HIV ayant la capacité d'induire les syncytiums [Nakayama EE *et al.*, 2000].

Une étude évoquant le syndrome de Kaposi chez les patients HIV, a montré une association entre le développement de ce syndrome et le polymorphisme du promoteur 174G→C du gène IL-6 [Foster CB *et al.*, 2000].

Quant à IL-10 une autre cytokine TH₂, il a été observé qu'elle inhibait la réplication virale HIV-1 dans les macrophages. Après plusieurs analyses du taux sérique de IL-10 présent chez les patients HIV, il a été admis que cette interleukine contrôlait la prolifération du HIV en limitant le nombre de macrophages activés disponibles pour la réplication du HIV [Naif HM *et al.*, 1996; Than S *et al.*, 1997]. Un polymorphisme du promoteur en position -592C→A (IL-10 5'A) associé à une diminution de la production de IL-10, a été corrélé à une progression accélérée de l'infection HIV avec un effet tardif [Shin HD *et al.*, 2000]. L'allèle IL-10 5'A est dominant à l'instar des autres allèles tels que CCR5Δ32 ou CCR2b-V64I, et il est prévalent dans plusieurs populations (Caucasiens = 23,6%, Afro-américains = 40%, Hispaniques = 33% et Asiatiques = 60% [Carrington M *et al.*, 2001].

Concernant le TNF, en particulier le TNFα, les résultats des analyses de la relation TNFα et progression de l'infection HIV, sont discordants. Dans une cohorte de patients HIV européens, aucune association n'est observée entre les variants génétiques de la région promotrice de TNFα et l'évolution de l'infection HIV [Brinkman BM *et al.*, 1997]. Une autre étude portant sur une cohorte de patients HIV homosexuels américains suggère que parmi les différents génotypes TNFα, l'allèle -308A à l'état homozygote est faiblement associé à une

progression modérée de l'infection HIV [Knuchel MC *et al.*, 1998]. Auparavant Khoo *et al.* montrent chez des patients HIV anglais, qu'un polymorphisme de microsatellites situé dans le premier intron du gène TNF β , TNFc2, est fortement associé à un ralentissement de la progression de l'infection HIV [Khoo SH *et al.*, 1997].

2. CADRE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Après avoir campé le décor de l'étude dans le temps et l'espace, nous fixerons le but général avant de décrire les différents objectifs particuliers

2-1. CADRE DE L'ETUDE

Cette seconde partie de notre travail a aussi pour cadre principal le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (Gabon). Outre la section Recherches avec les Unités de Génétique et de Virologie, cette étude s'est aussi appuyée sur les activités de la consultation MST érigée à Franceville en 1997 par le CIRMF en collaboration avec le Programme National de lutte contre le SIDA (PNLS) du Gabon. Une autre structure ayant participé à ce travail est le Laboratoire d'Analyses Médicales du CIRMF.

Cette étude bien qu'effectuée à Franceville a aussi concerné les deux premières grandes villes du GABON, Libreville et Port-Gentil. En amont comme en aval de cette seconde partie de notre travail, a été impliquée l'Unité INSERM U458 de l'Hôpital Robert Debré à Paris par le transfert de technologie et par l'exploitation des résultats obtenus.

2-2. ETUDES ANTERIEURES

Le CIRMF est équipé d'un laboratoire de type P3 (ou LS3 pour level security 3) qui a déjà permis l'isolement et la caractérisation de virus de primates ainsi que leur étude par serotypage. C'est ainsi qu'ont pu être isolés et caractérisés les virus simiens, SIVcpz-GAB-1 chez les chimpanzés [Peeters M *et al.*, 1989], SIVmnd-GAB-1 chez les mandrills [Tsujimoto H *et al.*, 1988] et SIVrcm-GAB-1 chez les red-capped mangabeys [Georges-Courbot MC *et al.*, 1998]. L'Unité de Virologie du CIRMF possède des outils permettant de discriminer les différents lentivirus des primates humains et non humains par serotypage [Simon F *et al.*, 2001].

Une étude épidémiologique réalisée au CIRMF en 1997 chez 500 sujets âgés de 14 à 55 ans et résidant à Franceville, a montré une fréquence élevée de maladies sexuellement transmissibles. Dans cette population active, ont été observées une séro-prévalence élevée de *Chlamydia trachomatis* (59,6%) mais aussi dans une moindre mesure de *Treponema pallidum* (8,6%) et d'hépatite B (13,8%), et à l'opposé une fréquence très faible de HIV-1 (2%) [Bertherat E *et al.*, 1998].

La faible fréquence HIV-1 dans la population Gabonaise à Franceville mais aussi à Libreville et Port-Gentil, contraste avec la forte fréquence observée dans les pays avoisinants (Congo, RDC, RCA, Cameroun).

Le variant génétique CCR5- Δ 32 ayant été découvert comme conférant une résistance à l'infection HIV-1, nous l'avons recherché dans une population de 300 sujets vivant à Franceville sans succès [Lu CY *et al.*, Décembre 1997]. Cette étude préliminaire a été réalisée dans l'optique de rechercher des facteurs pouvant expliquer la faible séro-prévalence HIV au Gabon. Le fait qu'aucun de nos 300 sujets testés ne possédaient la délétion CCR5- Δ 32, ne réfute pas notre hypothèse quant à la participation de variants génétiques en l'occurrence ceux de CCR5 à la résistance contre l'infection HIV-1. Etant donné, qu'il a été prouvé que cette mutation était d'origine caucasienne, nous avons émis l'hypothèse que la faible séro-prévalence HIV-1 affichée au Gabon pouvait être due à la présence d'autres variants génétiques inconnues qui influenceraient la susceptibilité à l'infection HIV-1.

2-3 OBJECTIF GENERAL

L'objectif général de ce travail est de rechercher dans la population gabonaise des variants génétiques qui moduleraient l'entrée des virus HIV-1 dans les cellules-cibles (c'est-à-dire la susceptibilité à la transmission de l'infection).

2-4 OBJECTIFS SPECIFIQUES

Nous avons donc recherché dans notre étude les variants génétiques des chémokines, des co-récepteurs à chémokines et aussi des protéines de l'immunité non spécifique.

C'est ainsi que nous avons établi le génotypage des variants de :

- SDF-1 (chémokines des co-récepteurs CXCR4).
- CCR2b (co-récepteurs accessoires des souches M-tropiques)

Ensuite nous avons exploré sans a priori le gène du co-récepteur CCR5, précisément :

- la région codante du gène
- et la région régulatrice proximale.

Nous avons aussi étudié les variants génétiques de la protéine MBL impliquée au niveau de l'immunité non spécifique. Ces différents variants ont été recherchés dans deux populations gabonaises séronégative et séropositive HIV-1.

3. METHODOLOGIE

En dehors de la situation du lieu d'étude et des données cliniques des sujets, la méthodologie a consisté essentiellement à la réalisation de la méthode DGGE.

3-1. MATERIEL

3-1-1. Sites d'étude

Notre étude a été réalisée dans les 3 principales villes du Gabon. Les sujets séropositifs HIV-1 ont été recrutés par le canal des consultations MST de Libreville, Port-Gentil et Franceville. Ces 3 villes possèdent un brassage de population irréfutable. Libreville, capitale du Gabon, est le creuset de ce mélange ethnique avec plus de 350000 habitants. Port-Gentil est la capitale économique, c'est une ville pétrolière située à l'ouest sur la cote atlantique, qui compte plus de 50000 âmes. Enfin Franceville (plus de 30000 habitants) est la capitale minière située à l'est, elle enregistre ces dernières années une croissance accélérée de sa population avec l'arrivée de populations réfugiées.

3-1-2. Sujets

Deux groupes de sujets ont été établis en fonction de leur sérologie HIV. La séropositivité HIV a été réalisée au Laboratoire d'Analyse Médicales du CIRMF par la technique de western blot utilisant des anti-corps anti-HIV (Sanofi Diagnostic Pasteur, Paris, France). Il faut noter en outre que les ADN viraux ont été extraits des souches HIV des patients séropositifs. Le génotypage de ces souches par la technique de HMA (heteroduplex mobility assays) a été réalisé par l'Unité de Virologie du CIRMF sous la direction du Dr M. Makuwa. Les résultats montrent un sous-type A modestement fondateur (49%) et une diversité des souches virales HIV-1 (A, A/G, B, B/D, C, C/G, D, F, G, H) du groupe M.

Soient les deux groupes de sujets :

- Groupe séronégatif HIV

Il est de 234 sujets recrutés à Port-Gentil. Ce sont des militaires originaires d'ethnies différentes et appartenant à différentes régions du Gabon. Ce groupe de sujets séronégatifs HIV peut être assimilé à une population relativement à risque par rapport à la population générale.

- Groupe séropositif HIV

Il est constitué de 102 sujets recrutés dans les consultations MST des villes de Libreville, Port-Gentil et Franceville. Au moment du recrutement et de la sérologie, ces patients ne présentaient pas de symptômes du SIDA.

3-2. METHODES

La recherche de variants génétiques a été effectuée de deux manières selon que la variation de séquence recherchée était connue ou pas. En effet la détection de polymorphismes connus a été réalisée par PCR-RFLP ou PCR-SDM. L'exploration des autres anomalies de séquence a été effectuée par l'utilisation de l'électrophorèse en gradient de gel dénaturant.

3-2-1. Polymorphisme de restriction (RFLP)

Le principe de la RFLP a été déjà évoqué dans la première partie de notre travail consacrée aux facteurs génétiques impliqués dans l'infection palustre. Nous résumons dans le tableau 5 la séquence des amorces utilisée pour amplifier la région du gène contenant le variant recherché, mais aussi la nature de l'enzyme de restriction utilisé pour procéder à la digestion des produits amplifiés par PCR.

Variant génétique	Amorce	Séquence	Hybridation (T°)	Produit PCR	Endonucléase	Référence
CCR2b-V64I	CCR2-F3	5'atgctgtccacatctcgttc3'	55°C	604bp	<i>FokI</i>	Eugen-Olsen, 1998
	CCR2-R4	5'ggaatattccatcctcgtg3'				
SDF-1	SDF1-1	5'cagtcaacctgggcaaagcc3'	60°C	293bp	<i>MspI</i>	Winkler C, 1998
	SDF1-2	5'cctgagagtcctttgcggg3'				
CCR5-Δ32	CCR5-SP4	5'tttcattacacctgcagc3'	54°C	186bp		Samson M, 1996
	CCR5-PM6	5'cacagggtgtgag3'				
MBL G57E et G54D	MBP-3	5'gcaccagattgtaggacagag3'	57°C	340bp	<i>MboII</i> et <i>BanI</i>	Lipscombe R, 1992
	MBP-2	5'caggcagttcctctggaagg3'				

Tableau 5: Conditions de géotypage par la PCR-RFLP des différents variants génétiques

3-2-2. Electrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE)

3-2-2-1. Principe

L'électrophorèse en gradient de gel dénaturant ou DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) est une méthode sans à priori de détection des variations de séquence. Une variation de séquence dans un fragment d'ADN, affecte dans un sens ou un autre la température de fusion d'un domaine donné. Cette perturbation de la température si elle n'est pas sensible, le deviendra à la suite de l'incorporation d'une pince GC (GC clamp) à l'une des extrémités du segment d'ADN.

L'électrophorèse dans un gel de polyacrylamide possédant un gradient dénaturant chimique (urée + formamide) permet de discriminer deux fragments d'ADN ayant une ou plusieurs bases différentes. Selon la base substituée, la température de fusion est soit augmentée (fragment proche sur le gel du pôle de gradient élevé) ou soit abaissée (fragment proche du pôle de gradient faible après la migration). Une analyse informatique préalable de la séquence au moyen d'un algorithme (Lerman et Silverstein, 1987) indique les domaines de fusion et leur température de fusion, facilitant la détermination de conditions expérimentales. En présence d'un polymorphisme, nous obtenons trois cas correspondant aux homozygote normal, homozygote muté et hétérozygote. Sur le gel dénaturant, les fragments d'ADN des homozygotes normal et muté, présentent chacun une bande correspondant respectivement aux homoduplexes normal et muté. Quant au fragment d'ADN des hétérozygotes, il révèle 4 bandes à savoir 2 homoduplexes (normal et muté) et 2 hétéroduplexes résultant de l'appariement d'un brin muté (voir la figure 11).

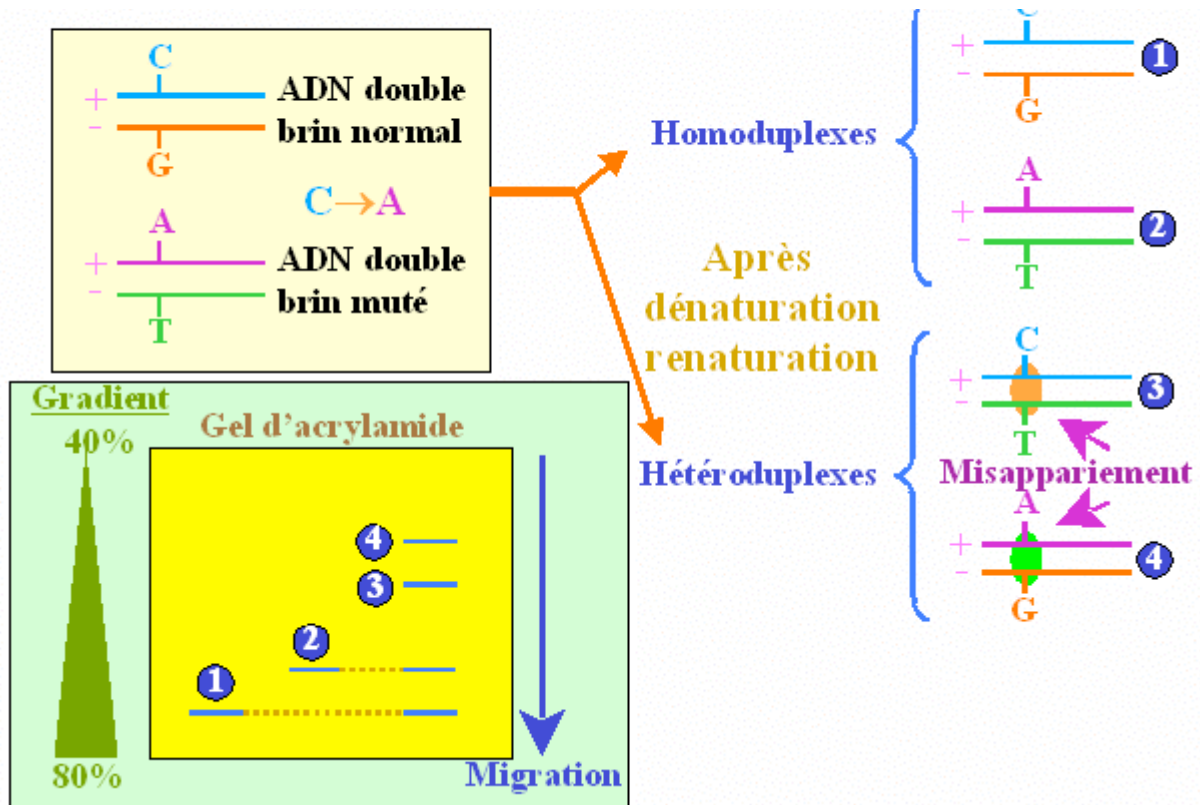


Figure 11: Principe de l'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (Extraite de la revue en ligne Biotribune.com)

3-2-2-2. Applications

Nous avons utilisé la DGGE pour rechercher les variations de séquence des régions suivantes :

- Région codante du gène CCR5

Nous avons exploré dans la région codante, une portion large de 801bp. Cette région comporte une partie de l'exon 4 et précisément la majeure partie du cadre de lecture ouvert (ORF open reading frame). Ce fragment de 801bp comprend les séquences codant pour les 6 premiers domaines trans-membranaires de la protéine CCR5. La séquence de référence utilisée est la séquence Genbank HSU95626, elle nous permet de situer la région explorée dans l'intervalle [61464-62264]. Afin de réaliser la recherche de mutations par la technique de

DGGE dans des conditions optimales, nous avons scindé notre région de recherche en 3 zones se recouvrant partiellement. (voir figure 12)

- Région promotrice proximale du gène CCR5

L'amplification par RACE-PCR des bouts d'ADNc, a permis de localiser deux régions de séquences régulatrices du gène CCR5 [Mummidi S *et al.*, 1997]. La région promotrice distale est retrouvée en 5' de l'exon 1 alors que la région proximale est proche de la jonction des exons 2 et 3.

La région promotrice que nous avons exploré, a une taille de 531bp et comprend les exons 2 et 3 du gène CCR5. Nous avons choisi la région promotrice proximale car il apparaît que les sites d'initiation de la transcription sont situés dans cette zone [Moriuchi H *et al.*, 1997; Guignard F *et al.*, 1998]. Cette région comporte des éléments de facteurs de liaison et de transcription tels que les motifs D-element like (ACAAAATAA), Octamere (ATGTAAAT), TATA like (TTAAT ou TTAA), TATA box, TCF1 (site de liaison des facteurs 1- α des cellules T), AT-rich (séquences riches en AT) et SIE-like (facteur inductible de croissance des plaquettes) [Tang J *et al.*, 1999]. Enfin, les transcrits initiés par la région proximale, apparaissent plus abondant que ceux initiés par la région distale dans les cellules T activées [Liu R *et al.*, 1998].

En utilisant comme séquence de référence la séquence Genbank HSU95626, la région explorée s'étend du nucléotide 59100 à 59630. Elle a ensuite été divisée en deux parties se recouvrant pour y pratiquer efficacement la recherche de mutations par DGGE (voir figure 12).

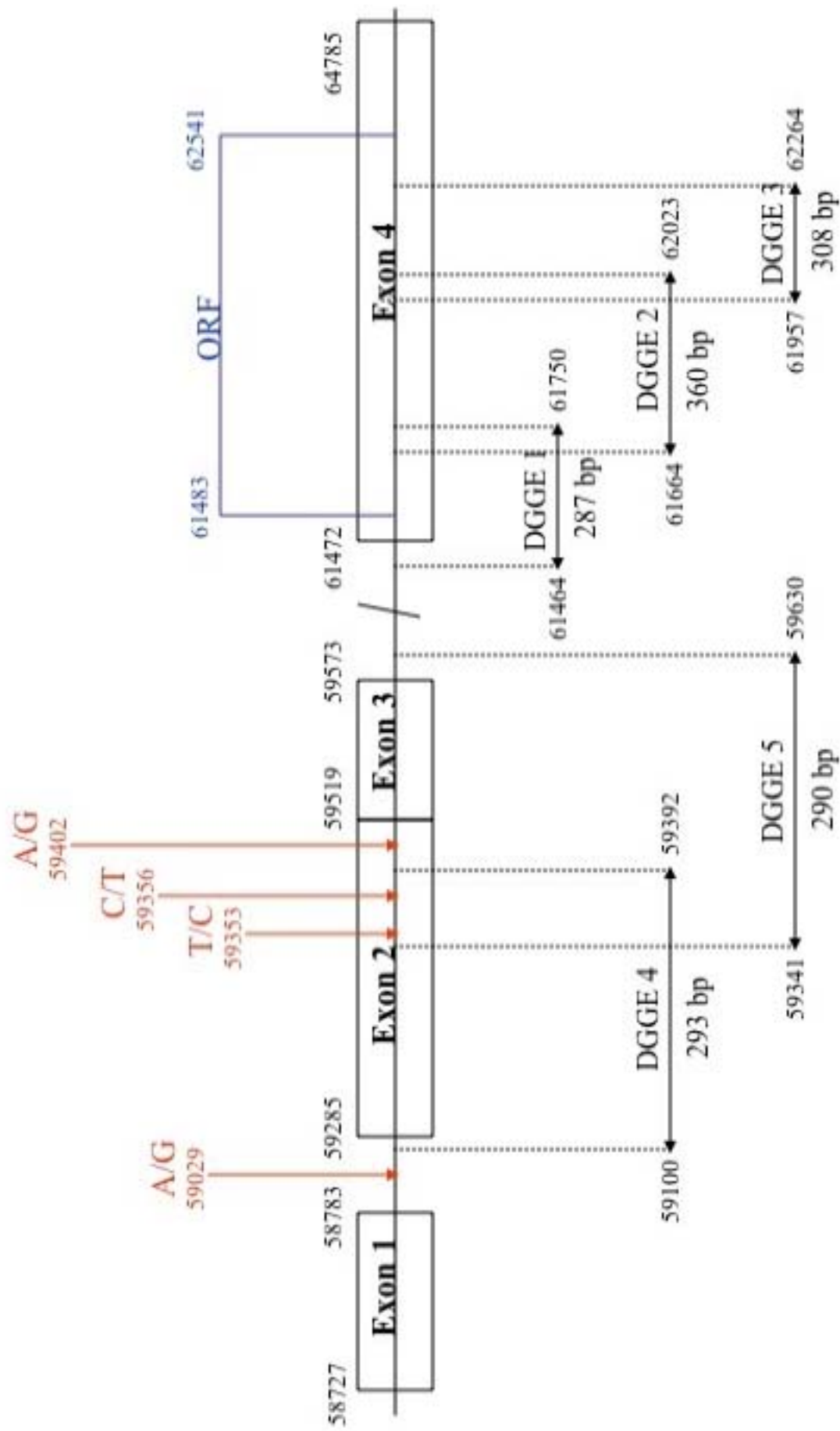


Figure 12: Carte génétique de la stratégie DGGE et des mutations concernées

- Région codant pour l'exon 1 du gène MBL

L'exon 1 du gène MBL comprend une première partie 5' non codante et une seconde partie qui elle code pour l'extrémité NH₂-terminale riche en cystéine et pour les 7 premiers motifs Gly-X-Y de la région collagène [Turner MW *et al.*, 2000].

Nous avons choisi d'étudier l'exon 1 car c'est dans cette région qu'ont été identifiées les 3 mutations (G54D, G57E et R52C). La région codant pour les triplets Gly-X-Y nous a le plus intéressé car les mutations qui y sont localisées, perturbent la polymérisation du domaine collagène en triple hélice. C'est ainsi que nous avons exploré, en utilisant la DGGE selon la technique mise en place par Gabolde *et al.*, un fragment de 221bp comprenant les $\frac{3}{4}$ de l'exon 1 et une partie de l'intron 1 [Gabolde M *et al.*, 1999].

Concernant l'exploration des gènes CCR5 et MBL, la séquence des amorces, la queue GC ajoutée, les conditions de la PCR ainsi que celles de la DGGE sont répertoriées dans le tableau 6.

Amorce	Séquence	Queue GC	Hybridation (T°)	Gradient utilisé	Temps de migration	Courbe de fusion
CCR5-O _R 5	5'atgcacagggtggaacaagatggat3'	0bp	57°C	30-70%	9h à 180volts	Annexe 1
CCR5-O _R 6	5'catagtgagcccagaaggggacagt3'	40bp				
CCR5-O _R 15	5'tgaagagcatgactgacatctacct3'	5bp	54°C	30-70%	8h à 180volts	Annexe 2
CCR5-O _R 16	5'gagagctgcaggtgtaatgaagac3'	50bp				
CCR5-O _R 17	5'gcgtctctcccaggaatcatct3'	0bp	56°C	20-60%	8h à 180volts	Annexe 3
CCR5-O _R 18	5'ggaaggtgttcaggagaaggaca3'	50bp				
CCR5-P _R 1U	5'ccgtaaataaacttcagacca3'	60bp	56°C	20-60%	8h à 180volts	Annexe 5
CCR5-P _R 1L	5'gtcttttactcatctcagaag3'	0bp				
CCR5-P _R 2U	5'gcaactcttaagataatcagaa3'	60bp	50°C	10-50%	8h à 180volts	Annexe 4
CCR5-P _R 2L	5'gagcttaaataagctagaga3'	0bp				
MBP-O _R 5	5'ctcagaaactgtgacctgtgaggat3'	0bp	57°C	40-80%	6h à 180volts	Gabolde M, 1999
MBP-O _R 6	5'ggcagtttctctggaagg3'	40bp				

Tableau 6: Conditions de réalisation de la méthode PCR-DGGE pour la recherche de mutations

4. RESULTATS

Les résultats concernant l'association entre les variants génétiques de CCR5 et la susceptibilité/résistance à l'infection HIV-1 n'étant pas encore publiés, nous les avons présenté de manière exhaustive. Quant à ceux relatifs aux variants génétiques de la MBL, ils ont fait l'objet d'une publication.

4-1. VARIANTS GENETIQUES DES CO-RECEPTEURS ET INFECTION HIV-1

4-1-1. Mutations dans la région codante du gène CCR5

Par l'utilisation des méthodes PCR-RFLP, DGGE et séquençage, nous avons analysé 6 mutations dont les résultats sont consignés dans le tableau 7.

Seules 4 mutations ont été retrouvées à l'état hétérozygote chez les sujets gabonais. De ces 4 mutations, seule une n'est pas répertoriée dans la littérature (V134G). Deux substitutions de nucléotides parmi les 4, entraînent un changement d'acides aminés, R60S et V134G. La majorité des mutations est rare (3/4), seule la mutation S75S atteint un taux polymorphe. Sa faible fréquence ne nous permet pas de la corréler statistiquement avec la susceptibilité/résistance à l'infection HIV-1.

Mutation	Groupe séronégatif HIV-1	Groupe séropositif HIV-1
CCR5-Δ32	0/234	0/102
CCR5-m303	0/234	0/102
CCR5-P35P (CCG→CCA)	2/234 (0,43%)	0/102
CCR5-R60S (AGG→AGT)	1/234 (0,21%)	0/102
CCR5-S75S (TCT→TCC)	7/234 (1,5%)	2/102 (1%)
CCR5-V134G (GTG→GGG)	1/234 (0,21%)	0/102

Tableau 7: Fréquence allélique des mutations de la région codante du gène CCR5

4-1-2. Allèles de SDF-1, de CCR2b et de la région promotrice CCR5

Les mutations des gènes SDF-1 et CCR2b révélées par la PCR-RFLP, et celles de la région promotrice proximale du gène CCR5 détectées par la DGGE, sont répertoriées suivant le groupe (séronégatif vs. séropositif HIV-1) dans le tableau 8.

Tous ces différents allèles corrélés avec l'absence ou la présence de l'infection HIV-1, font apparaître uniquement pour l'allèle CCR5-59356T une distribution différente de manière significative ($P = 0,04$) entre les 2 groupes. L'allèle CCR5-59356T à l'état homozygote est ainsi associé à une susceptibilité accrue à l'infection HIV-1. Par comparaison avec les valeurs théoriques données par la loi de Hardy-Weinberg, nous montrons une déviation de cette loi dans le groupe de sujets séronégatifs HIV-1. L'allèle CCR5-59356T à l'état homozygote est précisément sous-représenté chez les sujets séronégatifs ($P = 0,05$).

Variant	Sujets	Wt/Wt	Wt/Mut	Mut/Mut	Frequence allélique	Comparaison Obs. vs. Theor.	Comparaison HIV- vs. HIV+
SDF-1	HIV- observés (théorique)	225 (225)	9 (9)	0 (0)	0,02	P = 1	P = 0,974
	HIV+ observés (théorique)	98 (98)	4 (4)	0 (0)	0,0196	P = 1	
CCR2b-V64I	HIV- observés (théorique)	157 (158)	71 (68)	6 (8)	0,177	P = 0,838	P = 0,858
	HIV+ observés (théorique)	71 (71)	28 (28)	3 (3)	0,167	P = 1	
CCR5-59353T/C	HIV- observés (théorique)	73 (74)	117 (115)	44 (45)	0,438	P = 0,983	P = 0,818
	HIV+ observés (théorique)	32 (31)	48 (50)	22 (21)	0,451	P = 0,961	
CCR5-59356C/T	HIV- observés (théorique)	146 (153)	86 (72)	2 (9)	0,192	P = 0,05	P = 0,04
	HIV+ observés (théorique)	57 (58)	40 (38)	5 (6)	0,245	P = 0,927	
CCR5-59402A/G	HIV- observés (théorique)	194 (196)	40 (36)	0 (2)	0,0855	P = 0,329	P = 0,445
	HIV+ observés (théorique)	81 (82)	21 (19)	0 (1)	0,103	P = 0,575	

Tableau 8: Distribution des génotypes des variants SDF-1, CCR2b et CCR5-promoteur chez les sujets gabonais séronégatifs et séropositifs HIV-1

Dans un tableau de contingence 2×2 (tableau 9), nous avons confirmé par le test du Khi-deux l'association entre l'allèle CCR5-59356T à l'état homozygote et une susceptibilité élevée à l'infection HIV-1 (P = 0,017).

Génotype CCR5	Sujets non-infectés	Sujets infectés HIV-1	Test Khi ²
Non-CCR5-59356 T/T (CCR5-59356 C/C et C/T)	232	97	P = 0,0017
CCR5-59356 T/T	2	5	

Tableau 9: Distribution des sujets homozygotes mutés CCR5-59356T ou non dans les 2 groupes séronégatif et séropositif HIV-1

En tenant compte des 3 polymorphismes de la région promotrice proximale (en positions 59353, 59356 et 59402), nous avons retrouvé 4 haplotypes :

CCR5-P_D01 = C₅₉₃₅₃ C₅₉₃₅₆ A₅₉₄₀₂

CCR5-P_D02 = T₅₉₃₅₃ C₅₉₃₅₆ A₅₉₄₀₂

CCR5-P_D03 = T₅₉₃₅₃ T₅₉₃₅₆ A₅₉₄₀₂

CCR5-P_D04 = T₅₉₃₅₃ C₅₉₃₅₆ G₅₉₄₀₂

Dans le tableau 10, nous avons établi les différents haplotypes dans nos 2 groupes de sujets séronégatifs et séropositifs, puis analysé leur association avec par le test du Khi-deux.

Haplotypes	Sujets non-infectés	Sujets infectés HIV-1	Test Khi ²
P _D 01/P _D 01	44	22	
P _D 01/P _D X	117	48	P = 0,818
P _D X/P _D X	73	32	
P _D 02/P _D 02	22	5	
P _D 02/P _D X	89	31	P = 0,090
P _D X/P _D X	123	66	
P _D 03/P _D 03	2	5	
P _D 03/P _D X	86	40	P = 0,045
P _D X/P _D X	146	57	
P _D 04/P _D 04	0	0	
P _D 04/P _D X	40	21	P = 0,445
P _D X/P _D X	194	81	

Tableau 10: Distribution des différents haplotypes en relation avec la présence de l'infection HIV-1

Il ressort de ce tableau que l'haplotype P_D03 à l'état homozygote (P_D03/P_D03) est associé à une susceptibilité accrue à l'infection HIV-1 (P = 0,045). Les sujets homozygotes pour

l'haplotype P_D03 représentent 0,85% du groupe séronégatif et 4,90% du groupe séropositif HIV-1. La fréquence allélique de l'haplotype P_D03 est quant à elle de 19,2% chez les sujets séronégatifs et de 24,5% chez les sujets séropositifs HIV-1 (test T, P = 0,122 ; Voir figure 13).

Enfin ce tableau montre aussi une tendance pour l'haplotype P_D02 à être plutôt associé à une résistance à l'infection HIV-1 (P = 0,09). Cette tendance est matérialisée par une fréquence de sujets homozygotes pour cet haplotype de 9,4% dans le groupe séronégatif et de 4,9% dans le groupe séropositif HIV-1. Quant à la fréquence allélique de l'haplotype P_D02, elle est plus élevée chez les sujets séronégatifs que chez les sujets séropositifs HIV-1 (28,4% vs. 20,1% ; test T, P = 0,024 ; Voir figure 14).

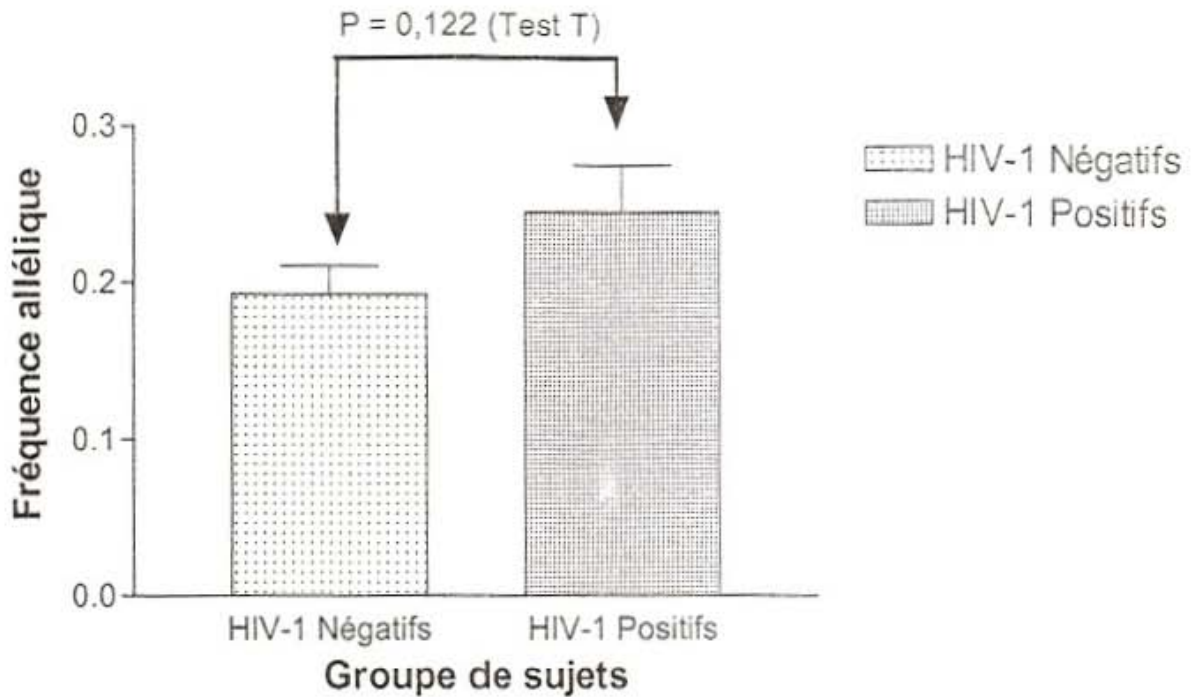


Figure 13: Fréquences alléliques comparées de l'haplotype CCR5-P_D03 entre les sujets séronégatifs et séropositifs HIV-1

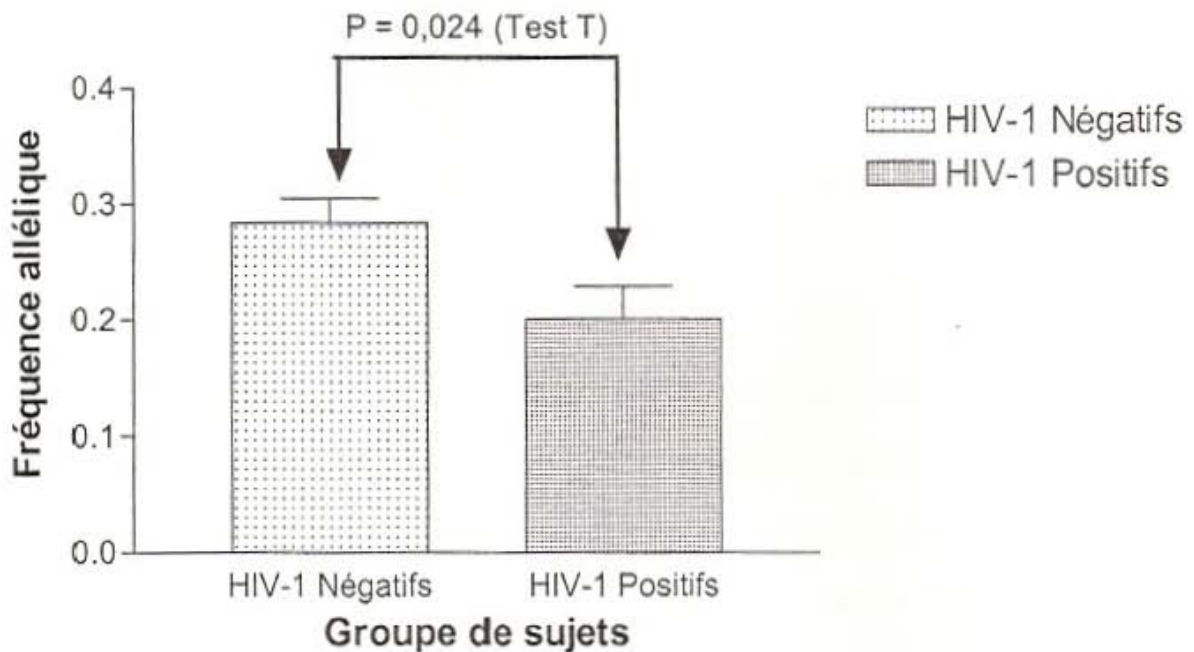


Figure 14: Fréquences alléliques comparées de l'haplotype CCR5-P_D02 entre les sujets séronégatifs et séropositifs HIV-1

4-1-3. Liaison entre CCR2b-V64I et haplotypes de la région promotrice CCR5

En considérant les 2 groupes de sujets réunis (N = 336), nous avons établi la fréquence allélique des différents polymorphismes, CCR2b-V64I = 17,4%, CCR5-59353 T→C = 44,2%, CCR5-59356 C→T = 20,8% et CCR5-59402 A→G = 9,1%.

Concernant les haplotypes de la région promotrice, nous avons déterminé leur fréquence dans notre population et l'avons comparé à une autre population africaine [données de Tang *et al.*, 1999] dans le tableau 11.

Haplotype du promoteur	Afrique centrale	Afrique de l'Est
proximal de CCR5	(Gabon, 2n = 672)	(Rwanda, 2n = 556)
CCR5-P _D 01	44,2%	54,1%
CCR5-P _D 02	25,9%	27,5%
CCR5-P _D 03	20,8%	7,4%
CCR5-P _D 04	9,1%	10,6%

Tableau 11: Fréquences des différents haplotypes de la région promotrice de CCR5 en Afrique Centrale et de l'Est

L'haplotype majoritaire dans la population gabonaise en particulier et africaine en général, est le CCR5-P_D01. L'haplotype CCR5-P_D03 par son absence dans les populations caucasiennes, aurait une origine africaine avec notamment une forte prévalence en Afrique Centrale. Par contre l'haplotype CCR5-P_D04 serait d'origine caucasienne, puisque sa fréquence est faible en Afrique et élevée en Europe.

Dans le tableau 12, nous avons étudié le déséquilibre de liaison entre l'allèle CCR2b-V64I et les différents haplotypes du promoteur proximal de CCR5.

Il ressort clairement de cette analyse que l'allèle CCR2b-V64I est fortement en déséquilibre de liaison avec l'haplotype du promoteur CCR5-P_D01 dans la population gabonaise ($\chi^2 = 173,4$; $P < 0,0001$).

A l'aide des profils DGGE des différentes mutations, nous remarquons que les 2 mutations CCR5-59353 T→C et CCR5-59356 C→T, sont situées sur des chromosomes différents. Par contre, la mutation CCR2b-V64I semble localisée sur le même chromosome que la mutation CCR5-59353 T→C.

Variant 1	Variant 2 (Promoteur CCR5)	n	1+/2+	1+/2-	1-/2+	1-/2-	Test Khi ²
CCR2b-V64I	Haplotype CCR5-P _D 01 CCA	336	116	1	181	374	$\chi^2 = 173,4; P < 0,0001$
CCR2b-V64I	Haplotype CCR5-P _D 02 TCA	336	1	116	173	382	$\chi^2 = 46,3; P < 0,0001$
CCR2b-V64I	Haplotype CCR5-P _D 03 TTA	336	0	117	140	415	$\chi^2 = 37,3; P < 0,0001$
CCR2b-V64I	Haplotype CCR5-P _D 04 TCG	336	0	117	61	494	$\chi^2 = 14,1; P = 0,0002$

Tableau 12: Liaisons entre l'allèle CCR2b-V64I et les différents haplotypes de la région promotrice du gène CCR5 par le test du Khi²

4-2. VARIANTS GENETIQUES DE MBL ET INFECTION HIV-1

Les résultats de l'analyse de la relation entre les variants génétiques de MBL et la susceptibilité à l'infection HIV-1, ont fait l'objet de la publication ci-après :

Mombo LE, Lu CY, Ossari S, Bedjabaga I, Sica L, Krishnamoorthy R, Lapoumériou C. Mannose-binding lectin variant alleles in Sub-Saharan Africans and susceptibility to infections. *Genes Immun* 2003 Jul;4(5):362-367.

Les analyses de la première partie de cet article nous ont permis d'établir le profil de distribution des variants alléliques du gène MBL dans la population africaine sub-saharienne. Il en résulte un profil différent entre l'Afrique Centrale et l'Afrique de l'Ouest, le variant allélique MBL-G57E d'origine africaine étant prédominant en Afrique de l'Ouest comparativement à l'Afrique Centrale.

Ensuite deux nouvelles mutations ont été découvertes (MBL-R52H et -IVS-1-5), et l'une d'elle atteint un taux polymorphe en Afrique Centrale (2,3%).

Enfin l'étude d'association révèle que l'allèle MBL-G57E à l'état homozygote ou hétérozygote composite, est associé à une susceptibilité accrue à l'infection HIV-1. En outre, nous observons que les individus hétérozygotes pour l'allèle MBL-G57E sont sur-représentés dans le groupe des sujets séronégatifs HIV-1.

Mannose-binding lectin alleles in sub-Saharan Africans and relation with susceptibility to infections

LE Mombo^{1,2}, CY Lu¹, S Ossari¹, I Bedjabaga¹, L Sica¹, R Krishnamoorthy² and C Lapoumeroulie²

¹Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF), Franceville, Gabon; ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Hôpital Robert Debré, Paris, France

Mannose-binding lectin (MBL) plays an important role in the early stages of primary infections and during the decay of maternal antibodies in infants. Various studies have looked at the relation between serum MBL concentrations, MBL gene alterations and susceptibility to infections. We investigated the distribution of variant MBL alleles in 626 unrelated adults from sub-Saharan African countries and looked for a potential relation between these alleles and the incidence, prevalence and death rate of tuberculosis for sub-Saharan Africa. We also evaluated the relation between MBL genotypes and susceptibility to HIV-1 infection in 188 Gabonese adults. We found that (i) the prevalence of the common variant MBL alleles is correlated with the incidence of tuberculosis in sub-Saharan Africa ($r=0.565$), (ii) the mutant MBL G57E allele, in either the homozygous or compound heterozygous state, is associated with susceptibility to HIV-1 infection in the Gabonese population ($P=0.019$). Our data plus those in the literature suggest that individuals who are homozygous for the mutant MBL alleles display increased susceptibility to infections. Interestingly, we found that individuals who are heterozygous for MBL mutations are much less susceptible to infections than those who are homozygous for the wild-type MBL allele.

Genes and Immunity (2003) 4, 362–367. doi:10.1038/sj.gene.6363979

Keywords: MBL allele; tuberculosis; HIV-1; Gabon; sub-Saharan Africa

Introduction

The mannose-binding lectin (MBL), or mannan-binding protein, is a calcium-dependent serum lectin secreted by hepatocytes. The human MBL gene is located on the long arm of chromosome 10 (10q11.2). It is ~7 kb in size and has four exons.¹ The primary structure of MBL can be divided into several domains: a signal peptide, a cysteine-rich region, a collagenous domain, a neck region (α -helix) and a carbohydrate-binding domain.²

MBL plays an opsonic role in host defense against pathogens bearing surface-exposed mannose residues. Its role consists in enhancing the attachment, ingestion and killing of opsonized pathogens by phagocytes.³ MBL also activates the complement system by virtue of its sugar-binding function in conjunction with a C1-like serine protease called the MBL-associated serine protease (MASP).⁴ MBL is functionally analogous (i) to IgM because of its carbohydrate recognition domain (CRD), (ii) to IgG because of its opsonic role and (iii) to C1q because of its ability to interact with MASP.⁵

MBL is believed to be particularly important in the early stages of primary infections and during the 'window of vulnerability' experienced by infants during the decay of maternal antibodies.⁵ Low serum MBL concentrations result in a defect in opsonization and a significant correlation exists between serum MBL concentrations, the generation of C3b opsonins and a

point mutation at codon 54 in exon 1 of the MBL gene (GGC→GAC), designated G54D.^{6,7} A second point mutation, first described in Gambians, at codon 57 of exon 1 (GGA→GAA) (G57E), is believed to disrupt the secondary structure of the collagenous triple helix of the MBL subunits, in the same manner as the G54D allele.⁸ A study in Kenyan and Danish populations revealed the presence of a third point mutation (R52C) at codon 52 (CGT→TGT).⁹ Two additional polymorphisms, at positions -550 (H/L variant) and -221 (X/Y variant) in the promoter region of the MBL gene, generate four different promoter haplotypes (HX, HY, LX and LY). The HY, LY and LX haplotypes are associated with high, medium and low serum MBL concentrations, respectively.¹⁰

Trans-racial studies have looked at the association between the status of MBL protein production, the MBL genotype and the clinical phenotype. The median MBL protein concentration is approximately five times lower among Africans than among Eskimos.¹¹ African subjects who are homozygous or heterozygous for the G57E allele have severely reduced MBL serum concentrations and hence a reduced capacity to activate the complement system.⁸ Other studies in Africans have suggested that MBL is involved in the pathogenesis of tuberculosis, but the relation remains to be confirmed.^{12,13}

MBL appears to recognize selectively high-mannose glycans found on the surface of the envelope glycoprotein of viruses such as HIV.³ *In vitro* studies have suggested that MBL recognizes a domain of the mannose glycans on the gp120 envelope protein that is recognized by CD4. This in turn suggests that MBL can inhibit the entry of the virus into the cells.¹⁴ These assumptions led

Correspondence: Dr LE Mombo, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U458, Hôpital Robert Debré, 48 boulevard Sérurier, 75019 Paris, France. E-mail: lemombo@yahoo.com

to studies on the relation between MBL serum concentrations, MBL gene mutations and susceptibility to HIV. However, most of these studies were carried out on Caucasian populations.^{15,16} No such studies have been carried out on Africans, even though they have a different prevalent mutant MBL allele (G57E).

The aim of this study was to establish the distribution profile of MBL alleles in sub-Saharan African population groups and then to analyze the influence of mutant MBL alleles on the incidence, prevalence and death rate of tuberculosis. We also evaluated the relation between MBL genotypes and susceptibility to HIV-1 infection in a Black African population from Gabon.

Results

MBL alleles in sub-Saharan Africa

The frequencies of the common variant MBL alleles (G54D and G57E) in African populations are summarized in Table 1a. In these sub-Saharan African samples, both the common G54D and G57E alleles followed the expected Hardy-Weinberg proportions. The frequency of the variant MBL alleles differed significantly between West Africa and Central Africa (0.33 vs 0.21, respectively; $P < 0.05$). The MBL R52C allele was not detected in individuals from West Africa or Central Africa. In all of the African countries studied, except Djibouti, the MBL G57E allele was significantly more prevalent than the G54D allele (0.28 vs 0.02, respectively; $P < 0.0001$).

Two novel variants were detected in subjects from West and Central Africa, because of their atypical denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiles (Figure 1), and both were found to consist of a G → A transition. The first variation (R52H), located at codon 52 of exon 1 (nucleotide position 155 of the open reading frame), caused an amino-acid change (arginine to histidine). The second variation (IVS-1-5 G → A) was located in the splice consensus sequence of the first

Table 1a Frequencies of the common variant MBL alleles in African countries

Countries	2n	G54D(G → A)	G57E(G → A)
Benin (W)	22	0	0.273
Burkina Faso (W)	32	0	0.313
Cameroon (C)	56	0	0.161
Central African Republic (C)	26	0	0.231
Chad (C)	22	0	0.227
Djibouti	28	0.214	0.143
Gabon (C)	428	0.026	0.187
Guinea (W)	42	0.071	0.310
Ivory Coast (W)	300	0.033	0.307
Madagascar	30	0.067	0.133
Mali (W)	40	0.025	0.325
Mauritania (W)	30	0.067	0.233
Niger (W)	54	0.019	0.241
Rwanda	40	0.025	0.150
Senegal (W)	58	0	0.379
Togo (W)	44	0	0.386
Central African region	4 countries	0.007	0.202
West African region	9 countries	0.024	0.307
West and Central Africa	13 countries	0.019	0.275

(W) and (C) indicate countries in West and Central Africa, respectively.

intron at position 5. In both cases, the sequence change creates an *Nla*III restriction site. Thus, this restriction enzyme was used to confirm the sequence variations. The representative restriction profiles are given in Figure 2. We found that the MBL IVS-1-5 G → A allele was much more frequent in Central African samples (2.3%) than in West African samples (0.5%). The R52H allele was rarely detected. In fact, it was only detected in Gabonese samples (2/428) and exclusively among subjects heterozygous for the G57E allele. The R52H and G57E mutations were found to be in *trans* position. The new R52H mutation (CGT → CAT) affects the second nucleotide of the same codon affected by the R52C mutation (CGT → TGT).

MBL alleles and tuberculosis in sub-Saharan Africa

The common MBL alleles (G54D and G57E) were most frequent in West Africa (33%). The incidence of

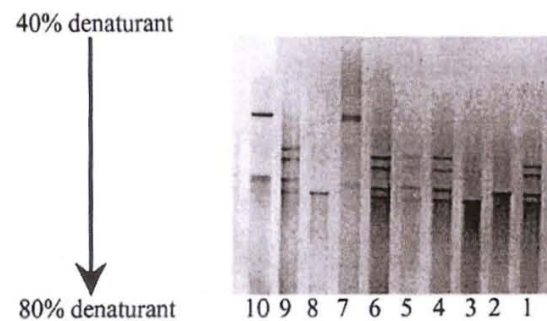


Figure 1 Profiles of different MBL genotypes observed in DGGE analysis. 1: G57E/Wt (heterozygote codon 57); 2: G57E/G57E (homozygote codon 57); 3: Wt/Wt (homozygote wild type); 4: IVS-1-5/Wt (heterozygote IVS-1-5 G/A); 5: G54D/Wt (heterozygote codon 54); 6: G57E/Wt (heterozygote codon 57); 7: G57E/R52H (compound heterozygote codon 57 and codon 52); 8: Wt/Wt (homozygote wild type); 9: IVS-1-5/Wt (heterozygote IVS-1-5 G/A); 10: G57E/Wt and G54D/Wt (compound heterozygote codon 57 and codon 54).

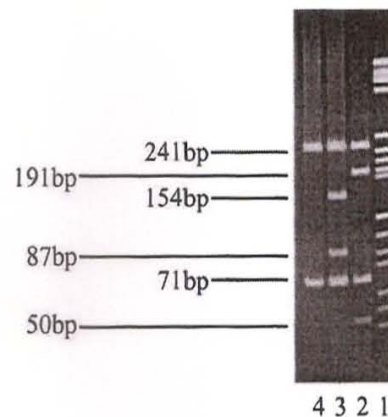


Figure 2 RFLP profiles of the two novel MBL variants (digestion by endonuclease *Nla*III). 1: Molecular weight marker V; 2: IVS-1-5/Wt (heterozygote IVS-1-5 G/A); five fragments (241, 191, 71, 50, 28 bp); 3: R52H/Wt (heterozygote codon 52); five fragments (241, 154, 87, 71, 28 bp); 4: Wt/Wt (homozygote wild type); three fragments (241, 71, 28 bp).

Table 1b Frequencies of the variant MBL alleles and tuberculosis data^a in West and Central Africa

Countries	MBL allele frequencies (G54D+G57E)	Tuberculosis data ^a		
		Incidence	Prevalence	Death rate
Benin	0.273	220	369	53
Burkina Faso	0.313	155	169	50
Cameroon	0.161	132	266	42
Central Afr. Rep.	0.231	237	264	125
Chad	0.227	205	330	53
Gabon	0.213	174	352	58
Guinea	0.381	171	286	41
Ivory Coast	0.340	289	332	112
Mali	0.350	292	507	65
Mauritania	0.300	261	617	66
Niger	0.259	143	278	39
Senegal	0.379	223	373	54
Togo	0.386	353	452	124
Pearson's test <i>r</i>		0.565	10.312	0.226

^aTuberculosis data are expressed per 100 000 subjects for 1997 and calculated by Dye *et al*¹⁷ as part of the WHO Global Surveillance and Monitoring Project.

tuberculosis is also high in this region (>250 per 100 000).¹⁷ In contrast, the Central African region has both a low MBL variant allele frequency (21%) and a low tuberculosis incidence (100–249 per 100 000).¹⁷ Table 1b summarizes the results of the evaluation of MBL (G54D and G57E) alleles and tuberculosis parameters in all subjects (West and Central Africa). We found a significant correlation between the prevalence of the common variant MBL alleles and the incidence of tuberculosis ($r=0.565$; $t=2.273$ with $n=13$; Pearson's test). However, the prevalence of the common variant MBL alleles was not correlated with the estimated death rate due to tuberculosis ($r=0.226$; Pearson's test).

MBL genotypes and HIV-1 infection in the Gabonese population

MBL genotyping was performed in HIV-1-positive ($n=68$) and HIV-1-negative ($n=120$) Gabonese subjects. The frequency of the variant MBL alleles in HIV-1-infected and -uninfected subjects did not differ significantly (0.206 and 0.167, respectively; Table 2a). However, all subjects who were homozygous for G57E or compound heterozygous for G57E and G54D were HIV-1-positive. An association was found between these MBL genotypes and HIV-1 status (Fisher's exact test; $P=0.019$). In contrast, there was no association between the G57E allele in the heterozygous state and susceptibility to HIV-1 infection.

In the uninfected group, the observed G57E allele distribution was significantly different from the expected Hardy-Weinberg distribution (χ^2 test; $P=0.05$). This was not the case in the HIV-1-infected group (Table 2b). In fact, individuals who were heterozygous for the G57E allele were over-represented in the HIV-1-uninfected group, whereas subjects who were homozygous for the G57E allele were under-represented.

Table 2a MBL genotypes in HIV-1-infected and -uninfected Gabonese subjects

Genotype	HIV-1-infected	HIV-1-uninfected
Wt/Wt	44	80
G57E/Wt	19	34
G54D/Wt	0	4
IVS-1-5/Wt	1	2
Mut/Wt	20	40
G57E/G57E	2	0
G57E/G54D	2	0
Mut/Mut*	4	0
Total	68	120

*Statistically significant ($P<0.05$).

Table 2b Genotype frequencies of the MBL G57E allele in HIV-1-infected and -uninfected Gabonese subjects

Genotype (MBL G57E)	HIV-1-infected ($n=68$)		HIV-1-uninfected ($n=120$)	
	Observed	Expected	Observed	Expected
Wild type	45	45.3	86	88.4
Heterozygous	21	20.4	34	29.2
Homozygous	2	2.3	0	2.4
Allele frequency	0.184		0.142	
P (χ^2 test)	0.9		0.05	

Discussion

MBL alleles in sub-Saharan Africa

There is a significant difference in the prevalence of variant MBL alleles between West and Central Africa

(33 vs 21%, respectively). A similar high prevalence rate has also been found in South Africa (27%).¹⁸ In this context, it is of particular interest to note that in South American populations, low serum MBL concentrations were primarily because of G54D mutation while in East Africa it is because of G57E mutation in combination with relatively high frequency of low-producing promoter haplotypes.¹⁹ Taken together, these data suggest that the MBL G57E mutation is indeed of sub-Saharan African origin and is the most ancient mutation, given its widespread distribution throughout Africa. In contrast, two novel mutations (R52H and IVS-I-5 G→A) might have arisen more recently, which explains why their distribution is restricted to Central Africa.

The MBL IVS-I-5 G→A mutation is located in the splice donor site of intron I. A mutation at the same position in the human β -globin gene results in impaired splicing and decreased synthesis of the β -globin chain.²⁰ Hence, it is reasonable to postulate that this mutation in the MBL gene affects the synthesis of the MBL protein. Like the R52C mutation, the R52H mutation results in an amino-acid change in the collagenous region, but the former substitution at this position does not seem to disrupt the Gly-Xaa-Yaa repeated structure.⁹ Although the newly substituted histidine is basic like arginine, it may differ from arginine in its interactions with other amino acids during the assembly of polypeptide chains and hence may have a negative effect on the stability of the multimer. Consequently, individuals who are compound heterozygous for G57E and R52H may lack MBL in the serum, as is the case with subjects who are compound heterozygous for G57E and R52C.⁹ Interestingly, R52C mutation was found to be associated with the same haplotype that is associated with G57E, the most common allele in this region (unpublished observation).

MBL alleles and tuberculosis

The overall frequency of mutant MBL alleles (29%) was high in sub-Saharan Africans. In other populations, the combined frequency of the G57E and G54D alleles is as follows: Eskimos (13%),¹¹ Hong Kong Chinese (17%),⁸ British Caucasians (11%),⁸ Danes (15%),⁶ and hence markedly lower than in Africans. Differences between variant MBL allele frequencies in Africans and in non-Africans are supported by the finding that the median MBL blood concentrations in Africans are two-fold lower than in Caucasians and five-fold lower than in Eskimos.¹¹ The high frequencies of variant MBL alleles in Africa suggest that these alleles may confer selective advantages.

In fact, in South Africa, a significant association was observed between the G54D allele and protection against the development of two forms of tuberculosis (tuberculous meningitis and pulmonary tuberculosis).¹² In Gambia, the G57E allele is weakly associated with resistance to tuberculosis and in Tanzania, a high serum concentration of MBL is associated with increased susceptibility to tuberculosis.^{13,21} In subjects homozygous for MBL wild-type alleles, the MBL protein (at normal/high serum concentrations) may activate the classical complement pathway, bind pathogenic mycobacteria efficiently and thus favor their spread.²² In contrast, in individuals with variant MBL alleles and consequently low MBL serum concentrations, this process may be hampered.

Our findings reveal a correlation between the frequencies of the common variant MBL alleles and the incidence of tuberculosis in sub-Saharan Africa and support the hypothesis that variant MBL alleles are associated with protection against tuberculosis. In other words, tuberculosis infection may be one of the driving forces in variant MBL allele selection. In addition, the findings that MBL deficiency is associated with resistance against leprosy and leishmaniasis suggest that MBL deficiency confers selective advantages against intracellular pathogens.^{23,24} The high prevalence of infections caused by intracellular pathogens in Africa may explain the elevated frequency of alleles causing low levels of MBL as compared to in Europe.

MBL alleles and HIV-1 infection

The second part of our study revealed that being homozygous or compound heterozygous for the G57E allele is associated with an increased risk of HIV-1 infection. In this context, it is noteworthy that in individuals with these genotypes, the MBL protein is either undetectable or only present in trace amounts (<20 $\mu\text{g}/\text{l}$).⁹ Furthermore, low serum MBL concentrations are associated with impairment, of phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes.⁶ Hence, subjects who are homozygous or compound heterozygous for the variant MBL alleles may have an opsonic impairment, and hence be unable to clear pathogens bearing surface-exposed mannose residues such as HIV. *In vitro* studies support this hypothesis, showing that MBL selectively recognizes high-mannose glycans on the gp120 expressed on the surface of HIV-infected cells and by opsonization-inhibited HIV infection.¹⁴ A more recent study showed that CCR5-tropic and CXCR4-tropic primary isolates of HIV-1, as well as macrophage-tropic virus strains bind MBL through CRD.²⁵ This study suggested that the MBL can selectively interact with HIV *in vivo* via CRD on gp120/gp41. An association has also been detected between susceptibility to HIV-1 infection, progression of AIDS and variant MBL alleles.¹⁵ This association is essentially strong among Caucasian populations, in which the G54D allele is the most prevalent. Our study concerned a native African population in which the G57E allele is the most prevalent. Such trans-racial confirmation of the role of MBL variants in HIV susceptibility highlights the importance of this locus in HIV infection.

MBL genotypes and infections

In the HIV-uninfected group, markers such as the CCR2 64I allele follow the expected Hardy-Weinberg proportions (unpublished data). Thus, the over-representation of subjects heterozygous for the G57E allele in the HIV-1-uninfected group may correspond to decreased susceptibility of such subjects to HIV-1 infection. This is further supported by the finding that HIV-1-infected men with variant MBL alleles (95% of whom were heterozygote) progressed more slowly to AIDS and death.²⁶ We previously reported that the variant MBL alleles, mainly in the heterozygous state, are prevalent in patients with sickle cell anemia who had not suffered severe infections.²⁷ Similarly, other studies have demonstrated that heterozygotes are protected against tuberculosis infection.^{12,15} This protective effect contrasts with the increased susceptibility of homozygotes (for the mutant MBL alleles) to various infections.^{28–31} Similarly, subjects

homozygous for the wild-type MBL allele display an increased risk of bacterial infections including tuberculosis.^{12,13,32}

To summarize, susceptibility to various infections, including HIV, increases progressively with the following MBL genotypes: (i) heterozygotes, (ii) homozygous for wild-type allele and (iii) homozygous or compound heterozygous for the mutant alleles. The positive selection of the heterozygous MBL genotype may explain the high variant MBL allele frequencies in Africa. This phenomenon reflects the notion of heterosis as observed with the sickle cell trait.²³

In conclusion, our study indicates that the frequency of variant MBL alleles, mainly G57E, is highest in sub-Saharan Africa and that the wide-spread nature of tuberculosis infection in this area may be one of the driving forces selecting these mutant alleles. In addition, the G57E allele in the homozygous or compound heterozygous state is associated with an increased risk of HIV-1 infection in Africans. The concept of a balanced polymorphism (the deleterious effects of the mutant homozygotes in terms of high susceptibility to infections is outweighed by the advantageous effects of heterozygotes) is probably applicable to the MBL gene, with an interesting extension towards homozygotes for the wild-type alleles. If this is indeed the case, the prevalence of mutant MBL alleles will continue to increase. Further, large-scale, long-term studies are needed to monitor this trend.

Materials and methods

Collection of blood samples

We studied two distinct cohorts in the two parts of this study.

1. For the first part, 626 blood samples were collected from randomly selected adults from 16 African countries (located in West, Central and East Africa and in the Indian Ocean region). Most of individuals come from Central African countries, particularly Gabon (214), and from West African countries, namely Ivory Coast (150).

2. To study the relation between MBL genotypes and HIV-1 infection in Gabon, two groups of individuals were recruited. The first group consisted of 120 HIV-1 seronegative individuals living in the city of Port-Gentil (Western Gabon) but originating from different parts of Gabon. The second group included 68 HIV-1 seropositive subjects from the major cities of Gabon (Libreville, Port-Gentil, Franceville). Seropositivity was confirmed by Western blotting with an anti-HIV-1 antibody (Sanofi Diagnostic Pasteur, Paris, France).

DNA was extracted from all blood samples by the phenol/chloroform procedure. Informed consent was obtained from all participants. The study design was approved by the institutional ethical committee of the CIRMF (International Center of Medical Research of Franceville, Franceville, Gabon).

Analysis of mutations

We used DGGE to screen for the different MBL alleles and subsequent sequencing were performed as described by Gabolde *et al.*³³ PCR-restriction fragment

length polymorphism (RFLP) analysis was carried out as described by Lipscombe *et al.*⁸ with a minor modification; a 340-bp fragment was amplified instead of a 328-bp fragment using the following primers: MBP2: 5'CAGGCAGTTTCCTCTGGAAGG3' (reverse), MBP3: 5'GCACCCAGATTGTAGGACAGAG3' (forward).

Site-directed mutagenesis (SDM) was carried out as described by Madsen *et al.*⁹

Statistical analysis

Pearson's test was used to study the correlation between MBL alleles and the incidence, prevalence and death rate of tuberculosis. Fisher's exact test was used to study the association between MBL genotypes and HIV-1 infection. χ^2 test was used to compare the observed and expected frequencies of the G57E allele.

Acknowledgements

We thank N Gerard, M Makuwa and C Tevi-Benissan for providing DNA samples, F Lekoulou, R Moukagni, A Moussavou, R Nabias and J Lansoud-Soukate for assistance with the field work, and A Luty for reading the manuscript. We are indebted to the subjects and especially the HIV patients for their participation in this study. This study was funded by INSERM and by the Centre International de Recherches Médicales (CIRMF-Gabon), which is supported by the Government of Gabon, ELF-Gabon and the Ministère Français des Affaires Étrangères.

References

- 1 Sastry K, Herman GA, Day L *et al.* The human mannose-binding protein gene. *J Exp Med* 1989; **170**: 1175-1189.
- 2 Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J* 1989; **262**: 763-771.
- 3 Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz RAB. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med* 1989; **169**: 1733-1745.
- 4 Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med* 1992; **176**: 1497-1502.
- 5 Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996; **17**: 532-540.
- 6 Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet* 1989; **i**: 1236-1239.
- 7 Sumiya M, Super M, Tabona P *et al.* Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 1991; **337**: 1569-1570.
- 8 Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AVS *et al.* High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 709-715.
- 9 Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JAL *et al.* A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 1994; **40**: 37-44.
- 10 Madsen HO, Garred P, Thiel S *et al.* Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 1995; **155**: 3013-3020.

- 11 Garred P, Madsen HO, Kurtzhals JAL *et al*. Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein in Eskimos, but not in Black Africans. *Eur J Immunogenet* 1992; 19: 403–412.
- 12 Hoal-Van Helden EG, Epstein J, Victor TC *et al*. Mannose-binding protein B allele confers protection against tuberculous meningitis. *Pediat Res* 1999; 45: 459–464.
- 13 Bellamy R, Ruwende C, Mcadam KPWJ *et al*. Mannose binding protein deficiency is not associated with malaria, hepatitis B carriage nor tuberculosis in Africans. *Q J Med* 1998; 91: 13–18.
- 14 Ezekowitz RAB, Kuhlman M, Groopman JE, Byrn RA. A human serum mannose-binding protein inhibits *in vitro* infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med* 1989; 169: 185–196.
- 15 Garred P, Madsen HO, Balslev U *et al*. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 1997; 349: 236–240.
- 16 Prohaszka Z, Thiel S, Ujhelyi E, Szlavik J, Banhegyi D, Fust G. Mannan-binding lectin serum concentrations in HIV-infected patients are influenced by the stage of disease. *Immunol Lett* 1997; 58: 171–175.
- 17 Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. *JAMA* 1999; 282: 677–686.
- 18 Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M *et al*. Mutation in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups. *Eur J Hum Genet* 1996; 4: 13–19.
- 19 Madsen HO, Satz ML, Høgh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol* 1998; 161: 3169–3975.
- 20 Lapoumèroulie C, Acuto S, Rouabhi F, Labie D, Krishnamoorthy R, Bank A. Expression of a beta thalassaemia gene with abnormal splicing. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 8195–8204.
- 21 Garred P, Richter C, Andersen AB *et al*. Mannan-binding lectin in the sub-Saharan HIV and tuberculosis epidemics. *Scand J Immunol* 1997; 46: 204–208.
- 22 Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* 1997; 277: 1091–1093.
- 23 Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet* 1994; 21: 125–131.
- 24 Santos IK, Costa CH, Krieger H *et al*. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2001; 69: 5212–5215.
- 25 Saifuddin M, Hart ML, Gewurz H, Zhang Y, Spear GT. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 2000; 81: 949–955.
- 26 Maas J, de Roda Husman AM, Brouwer M *et al*. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. *AIDS* 1998; 12: 2275–2280.
- 27 Neonato MG, Lu CY, Guilloud-Bataille M *et al*. Genetic polymorphism of the mannose-binding protein gene in children with sickle cell disease: identification of three new variant alleles and relationship to infections. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 679–686.
- 28 Garred P, Madsen HO, Hofmann B, Svejgaard A. Mannose-binding protein genotypes and recurrent infection. *Lancet* 1995; 346: 1629–1630.
- 29 Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M *et al*. Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 1995; 345: 886–889.
- 30 Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y *et al*. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. *Arch Virol* 1998; 143: 645–651.
- 31 Garred P, Madsen HO, Halberg P *et al*. Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 2145–2152.
- 32 McBride MO, Fischer PB, Sumiya M *et al*. Mannose-binding protein in HIV-seropositive patients does not contribute to disease progression or bacterial infections. *Int J STD AIDS* 1998; 9: 683–688.
- 33 Gabolde M, Muralitharan S, Besmond C. Genotyping of the three major allelic variants of the human mannose-binding lectin gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 1999; 14: 80–83.

5. DISCUSSION

5-1. VARIANTS DES RECEPTEURS A CHEMOKINES ET INFECTION HIV-1

5-1-1. Méthode d'analyses par DGGE des variants du promoteur de CCR5

Dans cette partie de notre travail et en dehors de l'étude d'associations, nous avons mis en place une technique de détection de polymorphismes par la méthode DGGE. Cette méthode a été utilisée avec beaucoup plus de succès concernant la région promotrice proximale du gène CCR5.

L'exploration de la région codante du gène CCR5 a révélé plusieurs mutations rares et un seul polymorphisme. Ce polymorphisme (S75S) permettrait un impact fonctionnel non modifié, à moins qu'il y ait une lecture préférentielle du codon, une création de site cryptique d'épissage ou une structure secondaire d'ADN déstabilisée. La faible fréquence de ce polymorphisme ne nous a pas permis de réaliser une étude d'association.

Les polymorphismes à des fréquences élevées ont été retrouvés dans la région promotrice proximale du gène CCR5. C'est donc dans cette partie précise du gène que nous avons élaboré une méthode de détection par la DGGE. Elle nous a permis de déterminer les polymorphismes CCR5-59353 T→C et CCR5-59356 C→T à l'aide du premier couple d'amorces, puis le polymorphisme CCR5-59402 A→G grâce à la seconde paire d'amorces. Avec donc 2 couples d'amorces, nous pouvons étudier les 3 polymorphismes principaux associés à la transmission et la progression de l'infection HIV-1 dans différentes types de populations [Martin MP *et al.*, 1998; Easterbrook PJ *et al.*, 1999; Kostrikis LG *et al.*, 1999].

Cette méthode d'analyse possède les avantages de mettre à jour d'autres polymorphismes qui pourraient exister dans la même zone et de permettre l'analyse de 20 à 30 échantillons par gel.

Le coût de cette technique est relativement abordable et nous avons pu la mettre en place au Gabon, précisément au Centre International de Recherches Médicales de Franceville.

La plupart des équipes de recherches utilisent jusqu'à présent le séquençage automatique pour effectuer le génotypage de cette région promotrice. Le coût de cette opération est prohibitif pour les laboratoires des pays en développement et ainsi le séquençage devrait intervenir en aval pour confirmer une séquence.

En dehors du séquençage direct, la détection de polymorphismes a été aussi mise en place par la technique de PCR-multiplex [Kristiansen TB *et al.*, 2001]. Elle présente le défaut d'amplifier en compétition les différentes régions du gène, et surtout elle n'a été utilisée que pour identifier des polymorphismes éloignés (CCR2b-V64I, CCR5-59029A→G et CCR5-Δ32).

La détection de mutations par la technique de DGGE a été aussi proposée par une équipe de recherches d'Afrique du Sud mais ciblée sur d'autres régions, la partie codante du gène CCR5 [Petersen DC *et al.*, 2001] et le gène CCR2b [Petersen DC *et al.*, 2002].

5-1-2. Etude d'associations des polymorphismes du promoteur de CCR5

Il est acquis que des deux régions du gène CCR5 régulant sa transcription, la plus efficace, celle ayant une forte régulation, est celle que nous avons choisi d'étudier qui comprend l'intron 1 et les exons 2 et 3. [Mummidi S *et al.*, 1997; Moriuchi H *et al.*, 1997].

Dans cette région promotrice proximale, 4 polymorphismes ont été associés à la susceptibilité/résistance à la transmission et à la progression de l'infection HIV-1:

- CCR5-59029 [McDermott DH *et al.*, 1998; Clegg AO *et al.*, 2000; An P *et al.*, 2000; Knudsen TB *et al.*, 2001]
- CCR5-59353 [Martin MP *et al.*, 1998; Easterbrook PJ *et al.*, 1999; Clegg AO *et al.*, 2000; An P *et al.*, 2000; Ometto L *et al.*, 2001]

- CCR5-59356 [Martin MP *et al.*, 1998; Kostrikis LG *et al.*, 1999; An P *et al.*, 2000; John GC *et al.*, 2001; Ometto L *et al.*, 2001]
- CCR5-59402 [Martin MP *et al.*, 1998; An P *et al.*, 2000; Ometto L *et al.*, 2001].

La majorité de ces études d'association a été réalisée sur des sujets d'origine caucasienne. Elles ont mis en évidence l'association entre l'allèle CCR5-59353C à l'état homozygote et l'accélération de la progression de l'infection HIV-1 [Martin MP *et al.*, 1998; Clegg AO *et al.*, 2000; Ometto L *et al.*, 2001]. Il est à noter que cet allèle est en complet déséquilibre de liaison avec l'allèle CCR5-59029A, lequel est associé logiquement lui aussi avec la progression de l'infection HIV-1 [Clegg AO *et al.*, 2000; McDermott DH *et al.*, 1998]. Cette association concernant l'allèle CCR5-59353C, établie dans les populations caucasiennes, est absente dans les populations d'origine africaine [Martin MP *et al.*, 1998].

Par contre dans ces populations noires peu étudiées, il a été mis en évidence que :

- chez les Afro-américains, l'allèle CCR5-59356T à l'état homozygote est associé à une susceptibilité accrue à la transmission périnatale de l'infection HIV-1 [Kostrikis LG *et al.*, 1999]
- et chez les Africains de l'Est (Kenya), les sujets porteurs à l'état hétérozygote de ce même allèle présentaient un risque 3 fois plus accru de décès durant les 2 premières années de SIDA [John GC *et al.*, 2001].

Nos résultats concernent une population d'Afrique centrale dont la différence génétique avec la population afro-américaine n'est plus à prouver. En outre, cette région d'Afrique Centrale possède des arguments forts pour être la région d'origine de l'infection HIV-1. L'importance d'études dans cette région est alors un des points forts de notre travail. Nous avons ainsi mis en évidence que les sujets gabonais porteurs de l'allèle CCR5-59356T à l'état homozygote présentent une susceptibilité accrue à l'infection HIV-1. Ce résultat conforte ceux obtenus

dans les populations afro-américaines et est-africaines [Kostrikis LG *et al.*, 1999; John GC *et al.*, 2001].

Nous avons ensuite précisé cette association, en établissant quel haplotype est lié à cette susceptibilité à l'infection HIV-1. Il s'agit bien de l'haplotype P_D03 (T₅₉₃₅₃T₅₉₃₅₆A₅₉₄₀₂) à l'état homozygote (P_D03/P_D03). Si la susceptibilité conférée par l'allèle CCR5-59353C est observée uniquement dans les populations caucasiennes, il en est de même pour celle initiée par l'allèle CCR5-59356T (ou haplotype P_D03) dans les populations noires. En effet l'haplotype P_D03 est inexistant dans les populations caucasiennes [Tang J *et al.*, 1999]. Dans les populations noires africaines, l'haplotype P_D03 est prévalent en Afrique Centrale (Gabon = 20,8%) par rapport à l'Afrique de l'Est (Rwanda = 7,4%) [Tang J *et al.*, 1999]. L'hypothèse est alors émise de l'origine de cet haplotype P_D03 en Afrique Centrale. Un autre argument à la dualité fonctionnelle de ces deux allèles (CCR5-59353C et -59356T), est leur localisation sur deux chromosomes différents.

Enfin nous avons aussi dans ce travail confirmé le déséquilibre de liaison total entre l'allèle CCR2b-V64I et l'haplotype P_D01 (C₅₉₃₅₃C₅₉₃₅₆A₅₉₄₀₂). Dans la population caucasienne, ces deux variants possèdent des influences opposées [Martin MP *et al.*, 1998]. L'effet de l'allèle CCR2b-V64I sur la progression de l'infection HIV-1 est très variable et moins important chez les Caucasiens par rapport aux Noirs. Cela peut s'expliquer par l'effet opposé rapporté par la séquence promotrice P_D01 (C₅₉₃₅₃C₅₉₃₅₆A₅₉₄₀₂), malgré l'effet dominant de l'allèle CCR2b-V64I. Dans la population noire, cette opposition n'a pas lieu car la séquence promotrice P_D01 (C₅₉₃₅₃C₅₉₃₅₆A₅₉₄₀₂) n'y a aucune influence avérée, excepté pour les résultats de An P *et al.* [An P *et al.*, 2000]. A la vue de tout ceci, il devient de plus en plus probable que le mécanisme de l'effet protecteur dû à l'allèle CCR2b-V64I ne proviendrait pas via la liaison avec la région promotrice du gène CCR5.

5-2. VARIANTS GENETIQUES DE MBL ET INFECTION HIV-1

En déterminant l'association entre l'allèle MBL-G57E à l'état homozygote et la susceptibilité accrue à l'infection HIV-1, notre étude a permis de réaffirmer le rôle tenu par la protéine MBL dans l'infection HIV-1 (rôle entrevu dans plusieurs travaux *in vitro* et *in vivo*).

Les variants alléliques MBL-G57E et -G54D quoique différents, présentent un impact fonctionnel similaire respectivement dans les populations sub-sahariennes africaines et caucasiennes. L'exploration de l'exon 1 du gène MBL par la méthode DGGE, a permis de montrer que les 2 mutations MBL-G57E et -G54D avaient lieu sur des chromosomes différents. Cela expliquant le profil type homozygote observé chez les hétérozygotes composites surtout concernant l'effondrement du taux sérique de la protéine [Madsen HO *et al.*, 1994].

En outre, cette étude a permis de mettre en lumière l'importance du génotype MBL chez un sujet donné dans le contexte africain, en révélant des influences opposées entre les homozygotes et les hétérozygotes pour l'allèle MBL-G57E. L'avantage conféré par les allèles variants à l'état hétérozygote, serait un facteur entraînant la sélection positive de ceux-ci. Cela malgré l'effet délétère dû à l'état homozygote de ces variants alléliques. Nous avons là, le concept d'équilibre de polymorphisme que nous retrouvons notamment dans le cas de la drépanocytose [Garred P *et al.*, 1994].

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons abordé plusieurs questions "génétiques" pour lesquelles nous avons apporté notre contribution. Cette variété de paramètres étudiés, peut paraître comme une relative faiblesse de notre travail, mais elle exprime en réalité la dimension multifactorielle de la génétique de l'hôte dans l'expression de maladies infectieuses. Cette conception pluridisciplinaire a permis d'apporter des éléments de réponse à des questions peu abordées. Par ce travail, nous avons voulu créer un effet fondateur pour d'autres études monosectorielles. Des perspectives multiples s'ouvrent donc pour la suite de ces investigations de base et nous espérons que notre travail sera témoin de l'importance considérable de la génétique de l'hôte d'Afrique Centrale.

Le premier objectif de ce travail, a été de déterminer le profil génétique de différents marqueurs génétiques dans les populations d'Afrique centrale, très peu étudiées comparativement à d'autres régions africaines. Nous nous sommes focalisés dans ce premier aspect, sur la population gabonaise. Néanmoins, nous avons également mis en évidence une différence, en terme de fréquences alléliques des variants génétiques, entre les populations d'Afrique Centrale et celles de l'Ouest Africain.

Concernant le second objectif (le plus important de notre point de vue), nous avons réalisé des études d'associations et nous avons mis en exergue :

1. l'influence du variant G6PD-A⁻ dans la pathogenèse de l'infection palustre et son éventuel mécanisme d'action

Le variant génétique G6PD-A⁻ exerce une action protectrice contre l'infection palustre, mais celle-ci s'exprime différemment selon le génotype du variant G6PD-A⁻ (hétérozygote ou hémizyote), mais également (à la lumière d'autres études) en fonction de la sévérité de l'infection palustre.

2. l'impact du variant génétique TNF- α -238A dans la physiopathologie de l'infection palustre et son rôle double

Le variant génétique TNF- α -238A confère une action protectrice contre l'infection palustre clinique. L'un des mécanismes de cette protection est l'induction chez les sujets hétérozygotes pour ce variant, d'un large répertoire d'anticorps anti-parasitaires. A long terme, cette protection pourrait entraîner une anémie.

3. l'effet du variant génétique MBL-G57E, d'origine africaine, dans la susceptibilité à l'infection à HIV-1

A l'instar du variant génétique MBL-G54D dans les populations caucasiennes, le variant MBL-G57E est associé à l'état homozygote ou hétérozygote composite à une susceptibilité accrue de l'infection à HIV-1 dans la population africaine.

4. l'impact de l'haplotype P_D03 (à l'état homozygote) de la région promotrice du gène CCR5 dans la susceptibilité à l'infection à HIV-1

L'haplotype CCR5-P_D03 (autrement appelé CCR5-P3 dans les études américaines) de la région promotrice du gène du co-récepteur CCR5 est largement représenté en Afrique Centrale et il est associé, à l'état homozygote, à un risque accru à l'infection à HIV-1 dans la population sub-saharienne. A la lumière de nos résultats, la différence significative de prévalence de l'infection HIV-1 dans deux pays de l'Afrique sub-saharienne, résulterait d'une introduction relativement plus tardive du virus HIV-1 plutôt que d'une présence d'un polymorphisme génétique particulier.

5. l'implication des molécules CD1-E dans l'immunité clinique anti-palustre, suite à l'association entre l'allèle CD1-E*02 à l'état homozygote et la résistance contre les accès multiples de paludisme

"Last but not least", nous avons révélé, pour la première fois, l'association de l'allèle CD1-E*02 à l'état homozygote avec la protection contre les accès palustres. Cette association

concernant cet allèle largement présent en Afrique sub-saharienne, suggère l'implication de la molécule CD1E de façon directe ou indirecte dans l'immunité anti-toxique dans le paludisme.

Les deux parties de notre travail (facteurs génétiques *vs.* infection palustre et facteurs génétiques *vs.* infection à HIV-1), sont menées parallèlement et elles impliquent des facteurs génétiques humains différents, même si de nombreux déterminants génétiques communs aux deux infections, ont été retrouvés dans plusieurs études (cytokines, vitamine A et HLA).

Nous avons, nous le pensons, atteint nos objectifs en proposant des données génétiques sur les populations d'Afrique centrale (gabonaise en l'occurrence), mais surtout en établissant l'impact de la dimension génétique de l'hôte sur l'expression de ces 2 pandémies. La découverte d'un nouveau facteur génétique réalisée dans notre travail, témoigne du fait que les facteurs génétiques connus jusqu'alors, ne représentent que la "face émergée de l'iceberg", informative sur l'ampleur du travail de recherches qui reste à réaliser.

En termes de perspectives à moyens termes, nous avons choisi d'initier les études fonctionnelles des différents variants génétiques des molécules CD1 et d'étudier le mécanisme de leur implication dans la mise en place de l'immunité anti-palustre.

L'importance de la composante génétique de l'hôte est considérable car, outre son rôle dans la physiopathologie proprement dite de l'infection, elle peut être impliquée dans les orientations thérapeutiques. Compte tenu du drame que constituent ces pandémies, la mise en place d'un protocole thérapeutique, en fonction des données génétiques du patient africain, peut être un élément de réponse appréciable. Car un gain en terme de coût peut être opéré en utilisant un tel protocole.

Le choix de l'étude de la génétique de l'hôte marque notre volonté de remettre l'hôte humain au centre de la recherche concernant ces maladies infectieuses. L'étude de modèles murin (infections palustres) et simien (infections à VIH) est certes indispensable, mais force est de constater qu'il existe un "gap" considérable lorsqu'il s'agit d'extrapoler les conclusions de ces

études à l'homme. Un autre type de différences existe lorsqu'il faut cerner l'expression de ces pandémies dans chacune des trois populations suivantes, caucasienne, afro-américaine et africaine. Nous pensons que l'étude de ces différentes infections dans la population la plus touchée (ensemble des populations sub-sahariennes), est d'une urgence évidente. Le renforcement des capacités de recherches sur le continent africain et l'augmentation du nombre de travaux sur les cohortes africaines sub-sahariennes, constituent une voie essentielle à la compréhension de la physiopathologie de maladies infectieuses.

La génétique de l'hôte africain, devrait pouvoir s'étoffer par la création, à l'échelle régionale, de structures centralisatrices de données. Le développement de centres de génétique humaine, destinés à coordonner et à mettre à disposition des données propres à chaque région de l'Afrique (Ouest, Centre, Est et Sud) nous semble une démarche souhaitable. Sachant que quelques données existent dans certains pays africains, il serait requis d'obtenir l'implication d'institutions internationales avec une levée importante de moyens financiers pour mettre en place des centres viables. Et cela à l'heure où la question du financement de la recherche n'attire malheureusement encore trop peu de suffrages au niveau des politiques dans les pays occidentaux, particulièrement en France.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdalla S, Weatherall DJ, Wickramasinghe SN, Hughes M. The anaemia of *P. falciparum* malaria. *Br J Haematol.* 1980 Oct;46(2):171-83.
- Abu-Zeid YA, Abdulhadi NH, Theander TG, Hviid L, Saeed BO, Jepsen S, Jensen JB, Bayoumi RA. Seasonal changes in cell mediated immune responses to soluble *Plasmodium falciparum* antigens in children with haemoglobin AA and haemoglobin AS. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 Jan-Feb;86(1):20-2.
- Agarwal A, Guindo A, Cissoko Y, Taylor JG, Coulibaly D, Kone A, Kayentao K, Djimde A, Plowe CV, Doumbo O, Wellem TE, Diallo D. Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobin S. *Blood.* 2000 Oct 1;96(7):2358-63.
- Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw.* 1996 Apr-Jun;7(2):93-124.
- Aidoo M, Terlouw DJ, Kolczak MS, McElroy PD, ter Kuile FO, Kariuki S, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet.* 2002 Apr 13;359(9314):1311-2.
- Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol.* 1978 Apr;77(1):72-82.
- Aitman TJ, Cooper LD, Norsworthy PJ, Wahid FN, Gray JK, Curtis BR, McKeigue PM, Kwiatkowski D, Greenwood BM, Snow RW, Hill AV, Scott J. Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature.* 2000 Jun 29;405(6790):1015-6.
- Akinboye DO, Ogunrinade AF. Malaria and loaisis among blood donors at Ibadan, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(3):398-9.
- Al Yaman FM, Mokela D, Genton B, Rockett KA, Alpers MP, Clark IA. Association between serum levels of reactive nitrogen intermediates and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 May-Jun;90(3):270-3.
- Allan RJ, Beattie P, Bate C, Van Hensbroek MB, Morris-Jones S, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Strain variation in tumor necrosis factor induction by parasites from children with acute *falciparum* malaria. *Infect Immun.* 1995 Apr;63(4):1173-5.
- Allan RJ, Rowe A, Kwiatkowski D. *Plasmodium falciparum* varies in its ability to induce tumor necrosis factor. *Infect Immun.* 1993 Nov;61(11):4772-6.
- Allen SJ, Bennett S, Riley EM, Rowe PA, Jakobsen PH, O'Donnell A, Greenwood BM. Morbidity from malaria and immune responses to defined *Plasmodium falciparum* antigens in children with sickle cell trait in The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 Sep-Oct;86(5):494-8.
- Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND, Alpers MP, Peto TE, Clegg JB, Weatherall DJ. alpha+-Thalassemia protects children against disease caused by other infections as well as malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 23;94(26):14736-41.
- Allen SJ, O'Donnell A, Alexander ND, Mgone CS, Peto TE, Clegg JB, Alpers MP, Weatherall DJ. Prevention of cerebral malaria in children in Papua New Guinea by southeast Asian ovalocytosis band 3. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Jun;60(6):1056-60.
- Allison AC. Protection afforded by sickle cell trait against subtertial malaria infection. *Br Med J.* 1954;1:290-4.
- 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 *Plasmodium falciparum* in a highly endemic area: a prospective community study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997 Sep-Oct;91(5):602-5.
- Amara A, Gall SL, Schwartz O, Salamero J, Montes M, Loetscher P, Baggiolini M, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med.* 1997 Jul 7;186(1):139-46.

- Ambroise-Thomas P, Picot S, Pelloux H. Pathophysiology of malaria. The current issue. *Bull Soc Pathol Exot.* 1992;85(2):150-5.
- An P, Martin MP, Nelson GW, Carrington M, Smith MW, Gong K, Vlahov D, O'Brien SJ, Winkler CA. Influence of CCR5 promoter haplotypes on AIDS progression in African-Americans. *AIDS.* 2000 Sep 29;14(14):2117-22.
- An P, Nelson GW, Wang L, Donfield S, Goedert JJ, Phair J, Vlahov D, Buchbinder S, Farrar WL, Modi W, O'Brien SJ, Winkler CA. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jul 23;99(15):10002-7. Epub 2002 Jul 11.
- Angenieux C, Salamero J, Fricker D, Cazenave JP, Goud B, Hanau D, de La Salle H. Characterization of CD1e, a third type of CD1 molecule expressed in dendritic cells. *J Biol Chem.* 2000 Dec 1;275(48):37757-64.
- Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, Arnelle DR, Hollis D, McDonald MI, Granger DL. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med.* 1996 Aug 1;184(2):557-67.
- Ball JK, Holmes EC, Whitwell H, Desselberger U. Genomic variation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): molecular analyses of HIV-1 in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. *J Gen Virol.* 1994 Apr;75 (Pt 4):67-79.
- Baptista JL, Vanham G, Wery M, Van Marck E. Cytokine levels during mild and cerebral falciparum malaria in children living in a mesoendemic area. *Trop Med Int Health.* 1997 Jul;2(7):673-9.
- Barnwell JW, Nichols ME, Rubinstein P. In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. *J Exp Med.* 1989 May 1;169(5):1795-802.
- Barragan A, Kremsner PG, Wahlgren M, Carlson J. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect Immun.* 2000 May;68(5):2971-5.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983 May 20;220(4599):868-71.
- Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, Taraschi TF, Howard RJ. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell.* 1995 Jul 14;82(1):77-87.
- Bate CA, Taverne J, Playfair JH. Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology.* 1988 Jun;64(2):227-31.
- Bayoumi RA, Bashir AH, Abdulhadi NH. Resistance to falciparum malaria among adults in central Sudan. *Am J Trop Med Hyg.* 1986 Jan;35(1):45-55.
- Bayoumi RA. The sickle-cell trait modifies the intensity and specificity of the immune response against *P. falciparum* malaria and leads to acquired protective immunity. *Med Hypotheses.* 1987 Mar;22(3):287-98.
- Beadle C, McElroy PD, Oster CN, Beier JC, Oloo AJ, Onyango FK, Chumo DK, Bales JD, Sherwood JA, Hoffman SL. Impact of transmission intensity and age on *Plasmodium falciparum* density and associated fever: implications for malaria vaccine trial design. *J Infect Dis.* 1995 Oct;172(4):1047-54.
- Beales PF. Anaemia in malaria control: a practical approach. *Ann Trop Med Parasitol.* 1997 Oct;91(7):713-8.
- Bellamy R, Kwiatkowski D, Hill AV. Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998 May-Jun;92(3):312-6.
- Benazet F. Resistance of *Plasmodium berghei* to chloroquine and 4-aminoquinolines. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1965;45(4):455-8.
- Berendt AR, Simmons DL, Tansey J, Newbold CI, Marsh K. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 1989 Sep 7;341(6237):57-9.

- Bertherat E, Georges-Courbot MC, Nabias R, Georges AJ, Renaut A. Seroprevalence of four sexually transmitted diseases in a semi-urban population of Gabon. *Int J STD AIDS*. 1998 Jan;9(1):31-6.
- Biemba G, Dolmans D, Thuma PE, Weiss G, Gordeuk VR. Severe anaemia in Zambian children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Trop Med Int Health*. 2000 Jan;5(1):9-16.
- Bienzele U, Guggenmoos-Holzmann I, Luzzatto L. Malaria and erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in West Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 1979 Jul;28(4):619-21.
- Bienzele U, Guggenmoos-Holzmann I, Luzzatto L. *Plasmodium falciparum* malaria and human red cells. I. A genetic and clinical study in children. *Int J Epidemiol*. 1981 Mar;10(1):9-15.
- Blauvelt A, Asada H, Saville MW, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Yarchoan R, Katz SI. Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J Clin Invest*. 1997 Oct 15;100(8):2043-53.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*. 1996 Aug 29;382(6594):829-33.
- Bottius E, Guanzirolli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996 Jan-Feb;90(1):15-9.
- Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):409-18.
- Brabin BJ, Premji Z, Verhoeff F. An analysis of anemia and child mortality. *J Nutr*. 2001 Feb;131(2S-2):636S-645S; discussion 646S-648S.
- Brabin BJ. An analysis of malaria in pregnancy in Africa. *Bull World Health Organ*. 1983;61(6):1005-16.
- Brambilla A, Villa C, Rizzardi G, Veglia F, Ghezzi S, Lazzarin A, Cusini M, Muratori S, Santagostino E, Gringeri A, Louie LG, Sheppard HW, Poli G, Michael NL, Pantaleo G, Vicenzi E. Shorter survival of SDF1-3'A/3'A homozygotes linked to CD4+ T cell decrease in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*. 2000 Jul;182(1):311-5. Epub 2000 Jul 06.
- Brinkman BM, Keet IP, Miedema F, Verweij CL, Klein MR. Polymorphisms within the human tumor necrosis factor-alpha promoter region in human immunodeficiency virus type 1-seropositive persons. *J Infect Dis*. 1997 Jan;175(1):188-90.
- Burdin N, Brossay L, Kronenberg M. Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur J Immunol*. 1999 Jun;29(6):2014-25.
- Burgner D, Rockett K, Kwiatkowski D. Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child*. 1999 Aug;81(2):185-8.
- Burgner D, Xu W, Rockett K, Gravenor M, Charles IG, Hill AV, Kwiatkowski D. Inducible nitric oxide synthase polymorphism and fatal cerebral malaria. *Lancet*. 1998 Oct 10;352(9135):1193-4.
- Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science*. 1992 Jul 17;257(5068):383-7.
- Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, Simula G, Luzzatto L, Arese P. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2527-34.
- Carr JK, Salminen MO, Albert J, Sanders-Buell E, Gotte D, Birx DL, McCutchan FE. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *J Virol*. 1998 Jul 20;72(1):22-31.

- Carrington M, Kissner T, Gerrard B, Ivanov S, O'Brien SJ, Dean M. Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *Am J Hum Genet.* 1997 Dec;61(6):1261-7.
- Carrington M, Nelson G, O'Brien SJ. Considering genetic profiles in functional studies of immune responsiveness to HIV-1. *Immunol Lett.* 2001 Nov 1;79(1-2):131-40.
- Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science.* 1999 Mar 12;283(5408):1748-52.
- Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI, Mudgett JS. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1994 Mar 4;269(9):6765-72.
- Chen EY, Cheng A, Lee A, Kuang WJ, Hillier L, Green P, Schlessinger D, Ciccociola A, D'Urso M. Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. *Genomics.* 1991 Jul;10(3):792-800.
- Chene G. The epidemiology of HIV infection. *Rev Prat.* 1999 Oct 15;49(16):1732-7.
- Chiwakata CB, Hemmer CJ, Dietrich M. High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 2000 Jan;68(1):394-9.
- Chotivanich K, Udomsangpetch R, Pattanapanyasat K, Chierakul W, Simpson J, Looareesuwan S, White N. Hemoglobin E: a balanced polymorphism protective against high parasitemias and thus severe *P falciparum* malaria. *Blood.* 2002 Aug 15;100(4):1172-6.
- Chun TW, Engel D, Berrey MM, Shea T, Corey L, Fauci AS. Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8869-73.
- Clark IA, Chaudhri G. Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol.* 1988 Sep;70(1):99-103.
- Clark IA, Rockett KA. Nitric oxide and parasitic disease. *Adv Parasitol.* 1996;37:1-56.
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* 1986 Jul 18;233(4761):343-6.
- Clegg AO, Ashton LJ, Biti RA, Badhwar P, Williamson P, Kaldor JM, Stewart GJ. CCR5 promoter polymorphisms, CCR5 59029A and CCR5 59353C, are under represented in HIV-1-infected long-term non-progressors. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS.* 2000 Jan 28;14(2):103-8.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 1995 Dec 15;270(5243):1811-5.
- Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science.* 1995 Jan 27;267(5197):483-9.
- Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 1998 Sep 11;273(37):23799-804.
- Covell G. Relationship between malaria parasitemia and symptoms of the disease. *Bull World Health Organ.* 1960;22:605-19.
- Crandall I, Collins WE, Gysin J, Sherman IW. Synthetic peptides based on motifs present in human band 3 protein inhibit cytoadherence/sequestration of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 May 15;90(10):4703-7.
- Creasey A, Fenton B, Walker A, Thaithong S, Oliveira S, Mutambu S, Walliker D. Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 May;42(5):403-13.

- Cutbush M, Mollison PL, Parkin DM. A new human blood group. *Nature*. 1950;165:188-9.
- D'Alfonso S, Richiardi PM. A polymorphic variation in a putative regulation box of the TNFA promoter region. *Immunogenetics*. 1994;39(2):150-4.
- Dascher CC, Brenner MB. CD1 antigen presentation and infectious disease. *Contrib Microbiol*. 2003;10:164-82.
- Davidson EA, Gowda DC. Glycobiology of *Plasmodium falciparum*. *Biochimie*. 2001 Jul;83(7):601-4.
- de Jong BA, Westendorp RG, Bakker AM, Huizinga TW. Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF)-gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production. *Genes Immun*. 2002 Feb;3(1):25-9.
- de Souza JB, Todd J, Krishnegowda G, Gowda DC, Kwiatkowski D, Riley EM. Prevalence and boosting of antibodies to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and evaluation of their association with protection from mild and severe clinical malaria. *Infect Immun*. 2002 Sep;70(9):5045-51.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*. 1996 Sep 27;273(5283):1856-62.
- Deloron P, Ringwald P, Luty AJ, Renaut A, Minh TN, Mbessy JR, Millet P. Relationships between malaria prevalence and malaria-related morbidity in school children from two villages in central Africa. *Am J Trop Med Hyg*. 1999 Jul;61(1):99-102.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhardt M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):661-6.
- Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*. 1997 Jul 17;388(6639):296-300.
- Dezube BJ, Pardee AB, Beckett LA, Ahlers CM, Ecto L, Allen-Ryan J, Anisowicz A, Sager R, Crumpacker CS. Cytokine dysregulation in AIDS: in vivo overexpression of mRNA of tumor necrosis factor-alpha and its correlation with that of the inflammatory cytokine GRO. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1992;5(11):1099-104.
- Doherty PC, Zinkernagel RM. A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet*. 1975 Jun 28;1(7922):1406-9.
- Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology*. 1997 Sep 1;235(2):179-90.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1149-58.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 1996 Jun 20;381(6584):667-73.
- Duflo B, Maiga I, Pichard E, Diallo D, Diallo AN, Coulibaly T, Mahamane D, Traore HA. Hemoglobin C in a hospital milieu in Bamako (Mali). *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1985;78(3):393-400.
- Duthie MS, Wleklinski-Lee M, Smith S, Nakayama T, Taniguchi M, Kahn SJ. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycosylphosphoinositol-modified surface protein. *Infect Immun*. 2002 Jan;70(1):36-48.
- Dvorak JA, Miller LH, Whitehouse WC, Shiroishi T. Invasion of erythrocytes by malaria merozoites. *Science*. 1975 Feb 28;187(4178):748-50.
- Dybul M, Mercier G, Belson M, Hallahan CW, Liu S, Perry C, Herpin B, Ehler L, Davey RT, Metcalf JA, Mican JM, Seder RA, Fauci AS. CD40 ligand trimer and IL-12 enhance peripheral blood mononuclear cells and CD4+

T cell proliferation and production of IFN-gamma in response to p24 antigen in HIV-infected individuals: potential contribution of anergy to HIV-specific unresponsiveness. *J Immunol.* 2000 Aug 1;165(3):1685-91.

Easterbrook PJ, Rostron T, Ives N, Troop M, Gazzard BG, Rowland-Jones SL. Chemokine receptor polymorphisms and human immunodeficiency virus disease progression. *J Infect Dis.* 1999 Oct;180(4):1096-105.

Ekala MT, Jouin H, Lekoulou F, Issifou S, Mercereau-Puijalon O, Ntoumi F. Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (MSP1): genotyping and humoral responses to allele-specific variants. *Acta Trop.* 2002 Jan;81(1):33-46.

Ekala MT, Jouin H, Lekoulou F, Mercereau-Puijalon O, Ntoumi F. Allelic family-specific humoral responses to merozoite surface protein 2 (MSP2) in Gabonese residents with Plasmodium falciparum infections. *Clin Exp Immunol.* 2002 Aug;129(2):326-31.

Elissa N, Karch S, Bureau P, Ollomo B, Lawoko M, Yangari P, Ebang B, Georges AJ. Malaria transmission in a region of savanna-forest mosaic, Haut-Ogooue, Gabon. *J Am Mosq Control Assoc.* 1999 Mar;15(1):15-23.

Elissa N, Migot-Nabias F, Luty A, Renaut A, Toure F, Vaillant M, Lawoko M, Yangari P, Mayombo J, Lekoulou F, Tshipamba P, Moukagni R, Millet P, Deloron P. Relationship between entomological inoculation rate, Plasmodium falciparum prevalence rate, and incidence of malaria attack in rural Gabon. *Acta Trop.* 2003 Mar;85(3):355-61.

Emerman M. HIV-1, Vpr and the cell cycle. *Curr Biol.* 1996 Sep 1;6(9):1096-103.

Ensoli B, Nakamura S, Salahuddin SZ, Biberfeld P, Larsson L, Beaver B, Wong-Staal F, Gallo RC. AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells express cytokines with autocrine and paracrine growth effects. *Science.* 1989 Jan 13;243(4888):223-6.

Eugen-Olsen J, Iversen AK, Benfield TL, Koppelhus U, Garred P. Chemokine receptor CCR2b 64I polymorphism and its relation to CD4 T-cell counts and disease progression in a Danish cohort of HIV-infected individuals. Copenhagen AIDS cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 Jun 1;18(2):110-6.

Eugen-Olsen J, Iversen AK, Garred P, Koppelhus U, Pedersen C, Benfield TL, Sorensen AM, Katzenstein T, Dickmeiss E, Gerstoft J, Skinhoj P, Svejgaard A, Nielsen JO, Hofmann B. Heterozygosity for a deletion in the CKR-5 gene leads to prolonged AIDS-free survival and slower CD4 T-cell decline in a cohort of HIV-seropositive individuals. *AIDS.* 1997 Mar;11(3):305-10.

Ezekowitz RA, Kuhlman M, Groopman JE, Byrn RA. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *J Exp Med.* 1989 Jan 1;169(1):185-96.

Farnert A, Arez AP, Babiker HA, Beck HP, Benito A, Bjorkman A, Bruce MC, Conway DJ, Day KP, Henning L, Mercereau-Puijalon O, Ranford-Cartwright LC, Rubio JM, Snounou G, Walliker D, Zwetyenga J, do Rosario VE. Genotyping of Plasmodium falciparum infections by PCR: a comparative multicentre study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001 Mar-Apr;95(2):225-32.

Farnert A, Rooth I, Svensson, Snounou G, Bjorkman A. Complexity of Plasmodium falciparum infections is consistent over time and protects against clinical disease in Tanzanian children. *J Infect Dis.* 1999 Apr;179(4):989-95.

Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science.* 1993 Nov 12;262(5136):1011-8.

Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debre P, Theodorou I, Combadiere C. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science.* 2000 Mar 24;287(5461):2274-7.

Faye FB, Spiegel A, Tall A, Sokhna C, Fontenille D, Rogier C, Trape JF. Diagnostic criteria and risk factors for Plasmodium ovale malaria. *J Infect Dis.* 2002 Sep 1;186(5):690-5. Epub 2002 Aug 01.

Fernandez-Reyes D, Craig AG, Kyes SA, Peshu N, Snow RW, Berendt AR, Marsh K, Newbold CI. A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet.* 1997 Aug;6(8):1357-60.

- Fischer PR, Boone P. Short report: severe malaria associated with blood group. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Jan;58(1):122-3.
- Flatz G, Pik C, Sringam S. Haemoglobin E and beta-thalassaemia: their distribution in Thailand. *Ann Hum Genet.* 1965 Nov;29(2):151-70.
- Fleming AF, Storey J, Molineaux L, Iroko EA, Attai ED. Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria: Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait, malaria and survival. *Ann Trop Med Parasitol.* 1979 Apr;73(2):161-72.
- Flint J, Hill AV, Bowden DK, Oppenheimer SJ, Sill PR, Serjeantson SW, Bana-Koiri J, Bhatia K, Alpers MP, Boyce AJ, et al. High frequencies of alpha-thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature.* 1986 Jun 19-25;321(6072):744-50.
- Foster CB, Lehrnbecher T, Samuels S, Stein S, Mol F, Metcalf JA, Wyvill K, Steinberg SM, Kovacs J, Blauvelt A, Yarchoan R, Chanock SJ. An IL6 promoter polymorphism is associated with a lifetime risk of development of Kaposi sarcoma in men infected with human immunodeficiency virus. *Blood.* 2000 Oct 1;96(7):2562-7.
- Franks S, Koram KA, Wagner GE, Tetteh K, McGuinness D, Wheeler JG, Nkrumah F, Ranford-Cartwright L, Riley EM. Frequent and persistent, asymptomatic *Plasmodium falciparum* infections in African infants, characterized by multilocus genotyping. *J Infect Dis.* 2001 Mar 1;183(5):796-804. Epub 2001 Feb 08.
- Frevert U, Sinnis P, Cerami C, Shreffler W, Takacs B, Nussenzweig V. Malaria-circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med.* 1993 May 1;177(5):1287-98.
- Friedman MJ, Roth EF, Nagel RL, Trager W. The role of hemoglobins C, S, and Nbal in the inhibition of malaria parasite development in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1979 Sep;28(5):777-80.
- Friedman MJ. Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. *Nature.* 1979 Jul 19;280(5719):245-7.
- Gabolde M, Muralitharan S, Besmond C. Genotyping of the three major allelic variants of the human mannose-binding lectin gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat.* 1999;14(1):80-3.
- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983 May 20;220(4599):865-7.
- Ganczakowski M, Town M, Bowden DK, Vulliamy TJ, Kaneko A, Clegg JB, Weatherall DJ, Luzzatto L. Multiple glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in the Vanuatu archipelago (southwestern Pacific). *Am J Hum Genet.* 1995 Jan;56(1):294-301.
- Garcia A, Marquet S, Bucheton B, Hillaire D, Cot M, Fievet N, Dessein AJ, Abel L. Linkage analysis of blood *Plasmodium falciparum* levels: interest of the 5q31-q33 chromosome region. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Jun;58(6):705-9.
- Garred P, Harboe M, Oettinger T, Koch C, Svejgaard A. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis? *Eur J Immunogenet.* 1994 Apr;21(2):125-31.
- Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, Svejgaard A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet.* 1997 Jan 25;349(9047):236-40.
- Garred P, Madsen HO, Hofmann B, Svejgaard A. Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet.* 1995 Oct 7;346(8980):941-3.
- Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000 Mar 3;100(5):587-97.
- Gentilini M. Médecine tropicale. -5^{ème} édition. Paris : Flammarion, 1993. -682 pages.

- Georges-Courbot MC, Lu CY, Makuwa M, Telfer P, Onanga R, Dubreuil G, Chen Z, Smith SM, Georges A, Gao F, Hahn BH, Marx PA. Natural infection of a household pet red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*) with a new simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 1998 Jan;72(1):600-8.
- Goldfeld AE, Doyle C, Maniatis T. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(24):9769-73.
- Goldfeld AE, Tsai EY. TNF-alpha and genetic susceptibility to parasitic disease. *Exp Parasitol.* 1996 Nov;84(2):300-3.
- Gonzalez E, Bamshad M, Sato N, Mummidi S, Dhanda R, Catano G, Cabrera S, McBride M, Cao XH, Merrill G, O'Connell P, Bowden DW, Freedman BI, Anderson SA, Walter EA, Evans JS, Stephan KT, Clark RA, Tyagi S, Ahuja SS, Dolan MJ, Ahuja SK. Race-specific HIV-1 disease-modifying effects associated with CCR5 haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Oct 12;96(21):12004-9.
- Gonzalez E, Dhanda R, Bamshad M, Mummidi S, Geevarghese R, Catano G, Anderson SA, Walter EA, Stephan KT, Hammer MF, Mangano A, Sen L, Clark RA, Ahuja SS, Dolan MJ, Ahuja SK. Global survey of genetic variation in CCR5, RANTES, and MIP-1alpha: impact on the epidemiology of the HIV-1 pandemic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 24;98(9):5199-204.
- Gonzalez E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhanda R, Mummidi S, Kulkarni H, Bamshad MJ, Telles V, Anderson SA, Walter EA, Stephan KT, Deucher M, Mangano A, Bologna R, Ahuja SS, Dolan MJ, Ahuja SK. HIV-1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increased monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15;99(21):13795-800. Epub 2002 Oct 08.
- Gonzalez-Aseguinolaza G, de Oliveira C, Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, Taniguchi M, Bendelac A, Van Kaer L, Koezuka Y, Tsuji M. alpha-galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 18;97(15):8461-6.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med.* 1981 Dec 10;305(24):1425-31.
- Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, McMichael AJ, Rowland-Jones S. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med.* 1997 Feb;3(2):212-7.
- Gowda DC, Davidson EA. Protein glycosylation in the malaria parasite. *Parasitol Today.* 1999 Apr;15(4):147-52.
- Grau GE, Fajardo LF, Piguet PF, Allet B, Lambert PH, Vassalli P. Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science.* 1987 Sep 4;237(4819):1210-2.
- Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, Lambert PH. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med.* 1989 Jun 15;320(24):1586-91.
- Greenwood B, Mutabingwa T. Malaria in 2002. *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):670-2. Review.
- Guignard F, Combadiere C, Tiffany HL, Murphy PM. Gene organization and promoter function for CC chemokine receptor 5 (CCR5). *J Immunol.* 1998 Jan 15;160(2):985-92.
- Guinet F, Diallo DA, Minta D, Dicko A, Sissoko MS, Keita MM, Wellems TE, Doumbo O. A comparison of the incidence of severe malaria in Malian children with normal and C-trait hemoglobin profiles. *Acta Trop.* 1997 Nov;68(2):175-82.
- Gumperz JE, Brenner MB. CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol.* 2001 Aug;13(4):471-8.
- Gurtler LG, Zekeng L, Tsague JM, van Brunn A, Afane Ze E, Eberle J, Kaptue L. HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch Virol Suppl.* 1996;11:195-202.

- Hadley T, Saul A, Lamont G, Hudson DE, Miller LH, Kidson C. Resistance of Melanesian erythrocytes (ovalocytes) to invasion by *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium falciparum* malaria parasites in vitro. *J Clin Invest.* 1983 Mar;71(3):780-2.
- Haigwood NL, Zolla-Pazner S. Humoral immunity to HIV, SIV, and SHIV. *AIDS.* 1998;12 Suppl A:S121-32.
- Hamblin MT, Di Rienzo A. Detection of the signature of natural selection in humans: evidence from the Duffy blood group locus. *Am J Hum Genet.* 2000 May;66(5):1669-79. Epub 2000 Apr 12.
- Han J, Brown T, Beutler B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J Exp Med.* 1990 Feb 1;171(2):465-75.
- Han M, Hannick LI, DiBrino M, Robinson MA. Polymorphism of human CD1 genes. *Tissue Antigens.* 1999 Aug;54(2):122-7.
- Hansen DS, Siomos MA, Buckingham L, Scalzo AA, Schofield L. Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity.* 2003 Mar;18(3):391-402.
- Hay CM, Ruhl DJ, Basgoz NO, Wilson CC, Billingsley JM, DePasquale MP, D'Aquila RT, Wolinsky SM, Crawford JM, Montefiori DC, Walker BD. Lack of viral escape and defective in vivo activation of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes in rapidly progressive infection. *J Virol.* 1999 Jul;73(7):5509-19.
- Henderson LE, Sowder RC, Copeland TD, Benveniste RE, Oroszlan S. Isolation and characterization of a novel protein (X-ORF product) from SIV and HIV-2. *Science.* 1988 Jul 8;241(4862):199-201.
- Hildreth JE, Hampton R, Halsey NA. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can protect PBMC from infection by cell-associated HIV-1. *Clin Immunol.* 1999 Feb;90(2):203-12.
- Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, Bennett S, Brewster D, McMichael AJ, Greenwood BM. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature.* 1991 Aug 15;352(6336):595-600.
- Hill AV, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gao XM, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend AR, et al. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature.* 1992 Dec 3;360(6403):434-9.
- Hill AV. Genetic susceptibility to malaria and other infectious diseases: from the MHC to the whole genome. *Parasitology.* 1996;112 Suppl:S75-84.
- Hill AV. Malaria resistance genes: a natural selection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 May-Jun;86(3):225-6, 232.
- Hirono A, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jun;85(11):3951-4.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 1995 Jan 12;373(6510):123-6.
- Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, Booth J, Roberts JM, Tkachuk AN, Pole A, Coon H, Kariuki S, Nahlen BL, Mwaikambo ED, Lal AL, Granger DL, Anstey NM, Weinberg JB. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet.* 2002 Nov 9;360(9344):1468-75.
- Hoffman SL, Subramanian GM, Collins FH, Venter JC. *Plasmodium*, human and *Anopheles* genomics and malaria. *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):702-9. Review.
- Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med.* 2001 May 1;134(9 Pt 1):761-76.
- Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med.* 2001 May 15;134(10):978-96.

- Hogh B, Petersen E, Crandall I, Gottschau A, Sherman IW. Immune responses to band 3 neoantigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in subjects living in an area of intense malaria transmission are associated with low parasite density and high hematocrit value. *Infect Immun*. 1994 Oct;62(10):4362-6.
- Hommel M. Physiopathology of symptoms of malaria. Role of cytokines, cytoadherence and premunition. *Presse Med*. 1996 Jan 20;25(2):70-6.
- Horuk R, Chitnis CE, Darbonne WC, Colby TJ, Rybicki A, Hadley TJ, Miller LH. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science*. 1993 Aug 27;261(5125):1182-4.
- Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med*. 1996 Nov;2(11):1240-3.
- Hutagalung R, Wilairatana P, Looareesuwan S, Brittenham GM, Aikawa M, Gordeuk VR. Influence of hemoglobin E trait on the severity of *Falciparum* malaria. *J Infect Dis*. 1999 Jan;179(1):283-6.
- Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *J Immunol*. 1995 Dec 1;155(11):5306-13.
- Jarolim P, Palek J, Amato D, Hassan K, Sapak P, Nurse GT, Rubin HL, Zhai S, Sahr KE, Liu SC. Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 15;88(24):11022-6.
- Jayawardena-Wolf J, Bendelac A. CD1 and lipid antigens: intracellular pathways for antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2001 Feb;13(1):109-13.
- John GC, Bird T, Overbaugh J, Nduati R, Mbori-Ngacha D, Rostron T, Dong T, Kostrikis L, Richardson B, Rowland-Jones SL. CCR5 promoter polymorphisms in a Kenyan perinatal human immunodeficiency virus type 1 cohort: association with increased 2-year maternal mortality. *J Infect Dis*. 2001 Jul 1;184(1):89-92. Epub 2001 May 31.
- Joishy SK, Hassan K, Lopes M, Lie-Injo LE. Clinical, genetic and fertility studies of Indians with beta S-globin gene and the influence of Hb S on *Plasmodium falciparum* malaria infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988;82(4):515-9.
- Jones DC, Gelder CM, Ahmad T, Campbell IA, Barnardo MC, Welsh KI, Marshall SE, Bunce M. CD1 genotyping of patients with *Mycobacterium malmoense* pulmonary disease. *Tissue Antigens*. 2001 Jul;58(1):19-23.
- Jullien D, Afanassieff M, Claudy A, Nicolas JF, Kaiserlian D. CD1: une nouvelle famille de molécules présentatrices d'antigènes aux caractéristiques singulières. *Med-Sci*. 1999 Jan;1(15):7-14.
- Kamada N, Iijima H, Kimura K, Harada M, Shimizu E, Motohashi Si, Kawano T, Shinkai H, Nakayama T, Sakai T, Brossay L, Kronenberg M, Taniguchi M. Crucial amino acid residues of mouse CD1d for glycolipid ligand presentation to V(alpha)14 NKT cells. *Int Immunol*. 2001 Jul;13(7):853-61.
- Kanki PJ, Hamel DJ, Sankale JL, Hsieh C, Thior I, Barin F, Woodcock SA, Gueye-Ndiaye A, Zhang E, Montano M, Siby T, Marlink R, NDoye I, Essex ME, MBoup S. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis*. 1999 Jan;179(1):68-73.
- Kar S, Seth S, Seth PK. Prevalence of malaria in Ao Nagas and its association with G6PD and HbE. *Hum Biol*. 1992 Apr;64(2):187-97.
- Kaufmann GR, Cunningham P, Kelleher AD, Zaunders J, Carr A, Vizzard J, Law M, Cooper DA. Patterns of viral dynamics during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. The Sydney Primary HIV Infection Study Group. *J Infect Dis*. 1998 Dec;178(6):1812-5.
- Kaul R, Trabatttoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, Kariuki C, Ngugi EN, MacDonald KS, Ball TB, Clerici M, Plummer FA. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS*. 1999 Jan 14;13(1):23-9.

- Khoo SH, Pepper L, Snowden N, Hajeer AH, Valley P, Wilkins EG, Mandal BK, Ollier WE. Tumour necrosis factor c2 microsatellite allele is associated with the rate of HIV disease progression. *AIDS*. 1997 Mar 15;11(4):423-8.
- Kidson C, Lamont G, Saul A, Nurse GT. Ovalocytic erythrocytes from Melanesians are resistant to invasion by malaria parasites in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Sep;78(9):5829-32.
- Kieny MP. Structure and regulation of the human AIDS virus. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1990;3(4):395-402.
- Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Engl J Med*. 1995 Jan 26;332(4):228-32.
- Klatt EC. Pathology of AIDS. Version 7. Salt Lake City : University of Utah, 1998. -222 pages.
- Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, Kwiatkowski D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet*. 1999 Jun;22(2):145-50.
- Knuchel MC, Spira TJ, Neumann AU, Xiao L, Rudolph DL, Phair J, Wolinsky SM, Koup RA, Cohen OJ, Folks TM, Lal RB. Analysis of a biallelic polymorphism in the tumor necrosis factor alpha promoter and HIV type 1 disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998 Mar 1;14(4):305-9.
- Knudsen TB, Kristiansen TB, Katzenstein TL, Eugen-Olsen J; Copenhagen AIDS Study Group. Adverse effect of the CCR5 promoter -2459A allele on HIV-1 disease progression. *J Med Virol*. 2001 Nov;65(3):441-4.
- Koram KA, Bennett S, Adiamah JH, Greenwood BM. Socio-economic risk factors for malaria in a peri-urban area of The Gambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995 Mar-Apr;89(2):146-50.
- Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, Wolinsky SM, Zhang L, Guo Y, Deutsch L, Phair J, Neumann AU, Ho DD. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med*. 1998 Mar;4(3):350-3.
- Kostrikis LG, Neumann AU, Thomson B, Korber BT, McHardy P, Karanicas R, Deutsch L, Huang Y, Lew JF, McIntosh K, Pollack H, Borkowsky W, Spiegel HM, Palumbo P, Oleske J, Bardeguet A, Luzuriaga K, Sullivan J, Wolinsky SM, Koup RA, Ho DD, Moore JP. A polymorphism in the regulatory region of the CC-chemokine receptor 5 gene influences perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 to African-American infants. *J Virol*. 1999 Dec;73(12):10264-71.
- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994 Jul;68(7):4650-5.
- Kremsner PG, Winkler S, Wildling E, Prada J, Bienzle U, Graninger W, Nussler AK. High plasma levels of nitrogen oxides are associated with severe disease and correlate with rapid parasitological and clinical cure in *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996 Jan-Feb;90(1):44-7.
- Kristiansen TB, Knudsen TB, Ohlendorff S, Eugen-Olsen J. A new multiplex PCR strategy for the simultaneous determination of four genetic polymorphisms affecting HIV-1 disease progression. *J Immunol Methods*. 2001 Jun 1;252(1-2):147-51.
- Kruatrachue M, Bhaibulaya M, Klongkamnaunkarn K, Harinasuta C. Haemoglobinopathies and malaria in Thailand. *Bull World Health Organ*. 1969;40(3):459-63.
- Kuhlman M, Joiner K, Ezekowitz RA. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J Exp Med*. 1989 May 1;169(5):1733-45.
- Kumaratilake LM, Ferrante A, Rzepczyk C. The role of T lymphocytes in immunity to *Plasmodium falciparum*. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN-gamma: comparisons with tumor necrosis factor effects. *J Immunol*. 1991 Jan 15;146(2):762-7.

- Kun JF, Klabunde J, Lell B, Luckner D, Alpers M, May J, Meyer C, Kreamsner PG. Association of the ICAM-1Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambarene, Gabon. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Nov;61(5):776-9.
- Kun JF, Mordmuller B, Lell B, Lehman LG, Luckner D, Kreamsner PG. Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria. *Lancet.* 1998 Jan 24;351(9098):265-6.
- Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, May J, Mercereau-Puijalon O, Alpers M, Weinberg JB, Kreamsner PG. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G-954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria. *J Infect Dis.* 2001 Aug 1;184(3):330-6. Epub 2001 Jun 26.
- Kwiatkowski D, Cannon JG, Manogue KR, Cerami A, Dinarello CA, Greenwood BM. Tumour necrosis factor production in Falciparum malaria and its association with schizont rupture. *Clin Exp Immunol.* 1989 Sep;77(3):361-6.
- Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet.* 1990 Nov 17;336(8725):1201-4.
- Kwiatkowski D, Molyneux ME, Stephens S, Curtis N, Klein N, Pointaire P, Smit M, Allan R, Brewster DR, Grau GE, et al. Anti-TNF therapy inhibits fever in cerebral malaria. *Q J Med.* 1993 Feb;86(2):91-8.
- Lapoumeroulie C, Dunda O, Ducrocq R, Trabuchet G, Mony-Lobe M, Bodo JM, Carnevale P, Labie D, Elion J, Krishnamoorthy R. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet.* 1992 May;89(3):333-7.
- Lee B, Doranz BJ, Rana S, Yi Y, Mellado M, Frade JM, Martinez-A C, O'Brien SJ, Dean M, Collman RG, Doms RW. Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4. *J Virol.* 1998 Sep;72(9):7450-8.
- Lell B, May J, Schmidt-Ott RJ, Lehman LG, Luckner D, Greve B, Matousek P, Schmid D, Herbich K, Mockenhaupt FP, Meyer CG, Bienzle U, Kreamsner PG. The role of red blood cell polymorphisms in resistance and susceptibility to malaria. *Clin Infect Dis.* 1999 Apr;28(4):794-9.
- Levesque MC, Hobbs MR, Anstey NM, Vaughn TN, Chancellor JA, Pole A, Perkins DJ, Misukonis MA, Chanock SJ, Granger DL, Weinberg JB. Nitric oxide synthase type 2 promoter polymorphisms, nitric oxide production, and disease severity in Tanzanian children with malaria. *J Infect Dis.* 1999 Dec;180(6):1994-2002.
- Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev.* 1993 Mar;57(1):183-289.
- Lifson AR, Buchbinder SP, Sheppard HW, Mawle AC, Wilber JC, Stanley M, Hart CE, Hessol NA, Holmberg SD. Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J Infect Dis.* 1991 May;163(5):959-65.
- Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, Turner MW. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet.* 1992 Dec;1(9):709-15.
- Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X, Takamatsu JK, Saito H, Ishikawa Y, Akaza T, Juji T, Takebe Y, Ohishi T, Fukutake K, Maruyama Y, Yashiki S, Sonoda S, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Apr 13;96(8):4581-5.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):367-77.
- Liu R, Zhao X, Gurney TA, Landau NR. Functional analysis of the proximal CCR5 promoter. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998 Nov 20;14(17):1509-19.

- Liu SC, Zhai S, Palek J, Golan DE, Amato D, Hassan K, Nurse GT, Babona D, Coetzer T, Jarolim P, et al. Molecular defect of the band 3 protein in southeast Asian ovalocytosis. *N Engl J Med.* 1990 Nov 29;323(22):1530-8.
- Lopansri BK, Anstey NM, Weinberg JB, Stoddard GJ, Hobbs MR, Levesque MC, Mwaikambo ED, Granger DL. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet.* 2003 Feb 22;361(9358):676-8.
- Lu CY et al., Publication orale. X^{ème} Conférence Internationale sur le SIDA et les MST en Afrique (CISMA), 7-11 décembre 1997, Abidjan, Côte d'Ivoire.
- Lucotte G, Mercier G. Distribution of the CCR5 gene 32-bp deletion in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 Oct 1;19(2):174-7.
- Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998 Feb 12;338(7):436-45.
- Luty AJ, Mayombo J, Lekoulou F, Mshana R. Immunologic responses to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* in Gabonese children exposed to continuous intense infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1994 Dec;51(6):720-9.
- Luxemburger C, Ricci F, Nosten F, Raimond D, Bathet S, White NJ. The epidemiology of severe malaria in an area of low transmission in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997 May-Jun;91(3):256-62.
- Luzzi GA, Merry AH, Newbold CI, Marsh K, Pasvol G, Weatherall DJ. Surface antigen expression on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is modified in alpha- and beta-thalassemia. *J Exp Med.* 1991 Apr 1;173(4):785-91.
- Maas J, de Roda Husman AM, Brouwer M, Krol A, Coutinho R, Keet I, van Leeuwen R, Schuitemaker H. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. Amsterdam Cohort Study. *AIDS.* 1998 Dec 3;12(17):2275-80.
- Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, Svejgaard A. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics.* 1994;40(1):37-44.
- Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Svejgaard A. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol.* 1995 Sep 15;155(6):3013-20.
- Madsen HO, Satz ML, Hogh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol.* 1998 Sep 15;161(6):3169-75.
- Malaguarnera L, Musumeci S. The immune response to *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002 Aug;2(8):472-8. Review.
- Marsh K. Malaria--a neglected disease? *Parasitology.* 1992;104 Suppl:S53-69.
- Martin MP, Dean M, Smith MW, Winkler C, Gerrard B, Michael NL, Lee B, Doms RW, Margolick J, Buchbinder S, Goedert JJ, O'Brien TR, Hilgartner MW, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science.* 1998 Dec 4;282(5395):1907-11.
- Martin SK, Miller LH, Alling D, Okoye VC, Esan GJ, Osunkoya BO, Deane M. Severe malaria and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency: a reappraisal of the malaria/G-6-P.D. hypothesis. *Lancet.* 1979 Mar 10;1(8115):524-6.
- Martiney JA, Cerami A, Slater AF. Inhibition of hemozoin formation in *Plasmodium falciparum* trophozoite extracts by heme analogs: possible implication in the resistance to malaria conferred by the beta-thalassemia trait. *Mol Med.* 1996 Mar;2(2):236-46.
- Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet.* 1997 May;16(1):100-3.

- Mason DP, McKenzie FE, Bossert WH. The blood-stage dynamics of mixed *Plasmodium malariae*-*Plasmodium falciparum* infections. *J Theor Biol.* 1999 Jun 21;198(4):549-66.
- Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med.* 1981 Dec 10;305(24):1431-8.
- Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med.* 1992 Dec 1;176(6):1497-502.
- May J, Lell B, Luty AJ, Meyer CG, Kremsner PG. HLA-DQB1*0501-restricted Th1 type immune responses to *Plasmodium falciparum* liver stage antigen 1 protect against malaria anemia and reinfections. *J Infect Dis.* 2001 Jan 1;183(1):168-72. Epub 2000 Nov 10.
- Mazzoli S, Trabattoni D, Lo Caputo S, Piconi S, Ble C, Meacci F, Ruzzante S, Salvi A, Semplici F, Longhi R, Fusi ML, Tofani N, Biasin M, Villa ML, Mazzotta F, Clerici M. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med.* 1997 Nov;3(11):1250-7.
- McCormick CJ, Craig A, Roberts D, Newbold CI, Berendt AR. Intercellular adhesion molecule-1 and CD36 synergize to mediate adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to cultured human microvascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1997 Nov 15;100(10):2521-9.
- McDermott DH, Becroft MJ, Kleeberger CA, Al-Sharif FM, Ollier WE, Zimmerman PA, Boatman BA, Leitman SF, Detels R, Hajeer AH, Murphy PM. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS.* 2000 Dec 1;14(17):2671-8.
- McDermott DH, Colla JS, Kleeberger CA, Plankey M, Rosenberg PS, Smith ED, Zimmerman PA, Combadiere C, Leitman SF, Kaslow RA, Goedert JJ, Berger EA, O'Brien TR, Murphy PM. Genetic polymorphism in CX3CR1 and risk of HIV disease. *Science.* 2000 Dec 15;290(5499):2031.
- McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet.* 1998 Sep 12;352(9131):866-70.
- McElroy PD, Beier JC, Oster CN, Onyango FK, Oloo AJ, Lin X, Beadle C, Hoffman SL. Dose- and time-dependent relations between infective *Anopheles* inoculation and outcomes of *Plasmodium falciparum* parasitemia among children in western Kenya. *Am J Epidemiol.* 1997 May 15;145(10):945-56.
- McGrath KM, Hoffman NG, Resch W, Nelson JA, Swanstrom R. Using HIV-1 sequence variability to explore virus biology. *Virus Res.* 2001 Aug;76(2):137-60.
- McGregor IA, Wilson ME, Billewicz WZ. Malaria infection of the placenta in The Gambia, West Africa: its incidence and relationship to stillbirth, birthweight and placental weight. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77(2):232-44.
- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature.* 1994 Oct 6;371(6497):508-10.
- McGuire W, Knight JC, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis.* 1999 Jan;179(1):287-90.
- McKeating JA, Griffiths PD, Weiss RA. HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus-induced Fc receptor. *Nature.* 1990 Feb 15;343(6259):659-61.
- McKenzie FE, Bossert WH. Mixed-species *Plasmodium* infections of humans. *J Parasitol.* 1997 Aug;83(4):593-600.
- Mehlotra RK, Lorry K, Kastens W, Miller SM, Alpers MP, Bockarie M, Kazura JW, Zimmerman PA. Random distribution of mixed species malaria infections in Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Feb;62(2):225-31.
- Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, Mayaux MJ, Misrahi M, Le Chenadec J, Debre P, Rouzioux C, Delfraissy JF, Theodorou I. CCR5 delta32 deletion and reduced risk of toxoplasmosis in persons infected with human

immunodeficiency virus type 1. The SEROCO-HEMOCO-SEROGEST Study Groups. *J Infect Dis.* 1999 Sep;180(3):920-4.

Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, Rouzioux C, Deveau C, Sanson F, Debre P, Delfraissy JF, Theodorou I. Early protective effect of CCR-5 delta 32 heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. The SEROCO Study Group. *AIDS.* 1997 Sep;11(11):F73-8.

Michael NL, Chang G, Louie LG, Mascola JR, Dondero D, Birx DL, Sheppard HW. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med.* 1997 Mar;3(3):338-40.

Migot-Nabias F, Luty AJ, Minh TN, Fajardy I, Tamouza R, Marzais F, Charron D, Danze PM, Renaut A, Deloron P. HLA alleles in relation to specific immunity to liver stage antigen-1 from *Plasmodium falciparum* in Gabon. *Genes Immun.* 2001 Feb;2(1):4-10.

Migot-Nabias F, Luty AJ, Ringwald P, Vaillant M, Dubois B, Renaut A, Mayombo RJ, Minh TN, Fievet N, Mbessi JR, Millet P, Deloron P. Immune responses against *Plasmodium falciparum* asexual blood-stage antigens and disease susceptibility in Gabonese and Cameroonian children. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Sep;61(3):488-94.

Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):673-9. Review.

Miller LH, Good MF, Milon G. Malaria pathogenesis. *Science.* 1994 Jun 24;264(5167):1878-83.

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med.* 1976 Aug 5;295(6):302-4.

Mirones I, Oteo M, Parra-Cuadrado JF, Martinez-Naves E. Identification of two novel human CD1E alleles. *Tissue Antigens.* 2000 Aug;56(2):159-61.

Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpore J, Verra F, Konate A, Rastrelli E, Olivieri A, Calissano C, Paganotti GM, D'Urbano L, Sanou I, Sawadogo A, Modiano G, Coluzzi M. Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2001 Nov 15;414(6861):305-8.

Molano A, Park SH, Chiu YH, Nosseir S, Bendelac A, Tsuji M. Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependent and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. *J Immunol.* 2000 May 15;164(10):5005-9.

Molineaux L, Storey J, Cohen JE, Thomas A. A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different *Plasmodium* species, in particular *P. falciparum* and *P. malariae*. *Am J Trop Med Hyg.* 1980 Sep;29(5):725-37.

Molyneux ME. Cerebral malaria in children: clinical implications of cytoadherence. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 Aug;43(2 Pt 2):38-41.

Montefiori DC, Pantaleo G, Fink LM, Zhou JT, Zhou JY, Biliska M, Miralles GD, Fauci AS. Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors. *J Infect Dis.* 1996 Jan;173(1):60-7.

Montoya F, Restrepo M, Montoya AE, Rojas W. Blood groups and malaria. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994 Jan-Feb;36(1):33-8.

Moody DB, Briken V, Cheng TY, Roura-Mir C, Guy MR, Geho DH, Tykocinski ML, Besra GS, Porcelli SA. Lipid length controls antigen entry into endosomal and nonendosomal pathways for CD1b presentation. *Nat Immunol.* 2002 May;3(5):435-42.

Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci AS. Cloning and analysis of the promoter region of CCR5, a coreceptor for HIV-1 entry. *J Immunol.* 1997 Dec 1;159(11):5441-9.

Mota MM, Pradel G, Vanderberg JP, Hafalla JC, Frevert U, Nussenzweig RS, Nussenzweig V, Rodriguez A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cells before infection. *Science.* 2001 Jan 5;291(5501):141-4.

Mount DL, Nahlen BL, Patchen LC, Churchill FC. Adaptations of the Saker-Solomons test: simple, reliable colorimetric field assays for chloroquine and its metabolites in urine. *Bull World Health Organ.* 1989;67(3):295-300.

- Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, Craig FE, O'Connell P, Tryon V, Clark RA, Dolan MJ, Ahuja SK. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):786-93.
- Mummidi S, Ahuja SS, McDaniel BL, Ahuja SK. The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *J Biol Chem.* 1997 Dec 5;272(49):30662-71.
- Murphy PM. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996 Jun;7(1):47-64.
- Musey LK, Krieger JN, Hughes JP, Schacker TW, Corey L, McElrath MJ. Early and persistent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T helper dysfunction in blood and lymph nodes following acute HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 1999 Aug;180(2):278-84.
- Myint-Oo, Upston JM, Gero AM, O'Sullivan WJ. Reduced transport of adenosine in erythrocytes from patients with beta-thalassaemia. *Int J Parasitol.* 1993 May;23(3):303-7.
- Nagel RL, Raventos-Suarez C, Fabry ME, Tanowitz H, Sicard D, Labie D. Impairment of the growth of *Plasmodium falciparum* in HbEE erythrocytes. *J Clin Invest.* 1981 Jul;68(1):303-5.
- Nagel RL, Roth EF Jr. Malaria and red cell genetic defects. *Blood.* 1989 Sep;74(4):1213-21.
- Naif HM, Chang J, Ho-Shon M, Li S, Cunningham AL. Inhibition of human immunodeficiency virus replication in differentiating monocytes by interleukin 10 occurs in parallel with inhibition of cellular RNA expression. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996 Sep 1;12(13):1237-45.
- Naik RS, Branch OH, Woods AS, Vijaykumar M, Perkins DJ, Nahlen BL, Lal AA, Cotter RJ, Costello CE, Ockenhouse CF, Davidson EA, Gowda DC. Glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis. *J Exp Med.* 2000 Dec 4;192(11):1563-76.
- Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N, Taguchi H, Hitani A, Kawana-Tachikawa A, Fukushima M, Yamada K, Sugiura W, Oka SI, Ajisawa A, Sato H, Takebe Y, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J Virol.* 2000 Jun;74(12):5452-9.
- Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994 Sep 23;78(6):915-8.
- Nishimura T, Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Ohta A, Sato M, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Kawano T, Taniguchi M, Nakui M, Sekimoto M, Koda T. The interface between innate and acquired immunity: glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int Immunol.* 2000 Jul;12(7):987-94.
- Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, Luty A, Georges A, Millet P. High prevalence of the third form of merozoite surface protein-1 in *Plasmodium falciparum* in asymptomatic children in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 Nov-Dec;90(6):701-2.
- Ntoumi F, Mercereau-Puijalon O, Ossari S, Luty A, Reltien J, Georges A, Millet P. *Plasmodium falciparum*: sickle-cell trait is associated with higher prevalence of multiple infections in Gabonese children with asymptomatic infections. *Exp Parasitol.* 1997 Sep;87(1):39-46.
- Nussenblatt V, Semba RD. Micronutrient malnutrition and the pathogenesis of malarial anemia. *Acta Trop.* 2002 Jun;82(3):321-37.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature.* 1996 Aug 29;382(6594):833-5.
- O'Brien TR, Winkler C, Dean M, Nelson JA, Carrington M, Michael NL, White GC 2nd. HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32. *Lancet.* 1997 Apr 26;349(9060):1219.

- Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, Benjamin C, Ho M, Kan KE, Thway Y, Win K, Aikawa M, Lobb RR. Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*. 1992 Oct 1;176(4):1183-9.
- Ollomo B, Karch S, Bureau P, Elissa N, Georges AJ, Millet P. Lack of malaria parasite transmission between apes and humans in Gabon. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Apr;56(4):440-5.
- Olson JA, Nagel RL. Synchronized cultures of P falciparum in abnormal red cells: the mechanism of the inhibition of growth in HbCC cells. *Blood*. 1986 Apr;67(4):997-1001.
- Olumese PE, Adeyemo AA, Ademowo OG, Gbadegesin RA, Sodeinde O, Walker O. The clinical manifestations of cerebral malaria among Nigerian children with the sickle cell trait. *Ann Trop Paediatr*. 1997 Jun;17(2):141-5.
- Ometto L, Bertorelle R, Mainardi M, Zanchetta M, Tognazzo S, Rampon O, Ruga E, Chieco-Bianchi L, De Rossi A. Polymorphisms in the CCR5 promoter region influence disease progression in perinatally human immunodeficiency virus type 1-infected children. *J Infect Dis*. 2001 Mar 1;183(5):814-8. Epub 2001 Jan 24.
- Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, Tokunaga K. CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria. *Am J Hum Genet*. 2003 Feb;72(2):364-74. Epub 2002 Dec 27.
- Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwarlander B, Esparza J; WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002 Feb 1;29(2):184-90.
- Pain A, Urban BC, Kai O, Casals-Pascual C, Shafi J, Marsh K, Roberts DJ. A non-sense mutation in Cd36 gene is associated with protection from severe malaria. *Lancet*. 2001 May 12;357(9267):1502-3.
- Pantaleo G, Cohen OJ, Schacker T, Vaccarezza M, Graziosi C, Rizzarda GP, Kahn J, Fox CH, Schnittman SM, Schwartz DH, Corey L, Fauci AS. Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nat Med*. 1998 Mar;4(3):341-5.
- Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993 Mar 25;362(6418):355-8.
- Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1993 Feb 4;328(5):327-35.
- Park SH, Bendelac A. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):788-92.
- Pastinen T, Liitsola K, Niini P, Salminen M, Syvanen AC. Contribution of the CCR5 and MBL genes to susceptibility to HIV type 1 infection in the Finnish population. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998 May 20;14(8):695-8.
- Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat Med*. 1996 Apr;2(4):412-7.
- Peeters M, Honore C, Huet T, Bedjabaga L, Ossari S, Bussi P, Cooper RW, Delaporte E. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS*. 1989 Oct;3(10):625-30.
- Persidis A. Malaria. *Nat Biotechnol*. 2000 Jan;18(1):111-2.
- Petersen DC, Kotze MJ, Zeier MD, Grimwood A, Pretorius D, Vardas E, van Rensburg EJ, Hayes VM. Novel mutations identified using a comprehensive CCR5-denaturing gradient gel electrophoresis assay. *AIDS*. 2001 Jan 26;15(2):171-7.

- Petersen DC, Laten A, Zeier MD, Grimwood A, Rensburg EJ, Hayes VM. Novel mutations and SNPs identified in CCR2 using a new comprehensive denaturing gradient gel electrophoresis assay. *Hum Mutat.* 2002 Oct;20(4):253-9.
- Phillips RE, Pasvol G. Anaemia of Plasmodium falciparum malaria. *Baillieres Clin Haematol.* 1992 Apr;5(2):315-30. Review.
- Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science.* 1993 Mar 19;259(5102):1749-54.
- Pinto LA, Sullivan J, Berzofsky JA, Clerici M, Kessler HA, Landay AL, Shearer GM. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. *J Clin Invest.* 1995 Aug;96(2):867-76.
- Playfair JH, Taverne J, Bate CA, de Souza JB. The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? *Immunol Today.* 1990 Jan;11(1):25-7.
- Playfair JH, Taverne J. Antiparasitic effects of tumour necrosis factor in vivo and in vitro. *Ciba Found Symp.* 1987;131:192-205.
- Plummer FA. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV): interactions of conventional sexually transmitted diseases, hormonal contraception and HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998 Apr;14 Suppl 1:S5-10.
- Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:297-329.
- Pradines B, Mabika Mamfoumbi M, Parzy D, Owono Medang M, Lebeau C, Mourou Mbina JR, Doury JC, Kombila M. In vitro susceptibility of Gabonese wild isolates of Plasmodium falciparum to artemether, and comparison with chloroquine, quinine, halofantrine and amodiaquine. *Parasitology.* 1998 Dec;117(Pt 6):541-5.
- Quillent C, Oberlin E, Braun J, Rousset D, Gonzalez-Canali G, Metais P, Montagnier L, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Beretta A. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet.* 1998 Jan 3;351(9095):14-8.
- Rabkin CS, Yang Q, Goedert JJ, Nguyen G, Mitsuya H, Sei S. Chemokine and chemokine receptor gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood.* 1999 Mar 15;93(6):1838-42.
- Richie TL, Saul A. Progress and challenges for malaria vaccines. *Nature.* 2002 Feb 7;415(6872):694-701.
- Rihet P, Traore Y, Abel L, Aucan C, Traore-Leroux T, Fumoux F. Malaria in humans: Plasmodium falciparum blood infection levels are linked to chromosome 5q31-q33. *Am J Hum Genet.* 1998 Aug;63(2):498-505.
- Ringwald P, Peyron F, Lepers JP, Rabarison P, Rakotomalala C, Razanamparany M, Rabodonirina M, Roux J, Le Bras J. Parasite virulence factors during falciparum malaria: rosetting, cytoadherence, and modulation of cytoadherence by cytokines. *Infect Immun.* 1993 Dec;61(12):5198-204.
- 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 Feb;68(2):169-76.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* 2000 Apr 7;288(5463):55-6.
- Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH. Recombination in HIV-1. *Nature.* 1995 Mar 9;374(6518):124-6.
- Rockett KA, Awburn MM, Aggarwal BB, Cowden WB, Clark IA. In vivo induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infect Immun.* 1992 Sep;60(9):3725-30.
- Roger M. Influence of host genes on HIV-1 disease progression. *FASEB J.* 1998 Jun;12(9):625-32.

- Rogier C, Commenges D, Trape JF. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Jun;54(6):613-9.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science.* 1997 Nov 21;278(5342):1447-50.
- Rosenberg PS, Biggar RJ, Goedert JJ. Declining age at HIV infection in the United States. *N Engl J Med.* 1994 Mar 17;330(11):789-90.
- Roth EF Jr, Raventos Suarez C, Rinaldi A, Nagel RL. The effect of X chromosome inactivation on the inhibition of *Plasmodium falciparum* malaria growth by glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient red cells. *Blood.* 1983 Oct;62(4):866-8.
- Roth EF Jr, Raventos-Suarez C, Rinaldi A, Nagel RL. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jan;80(1):298-9.
- Rottman JB, Ganley KP, Williams K, Wu L, Mackay CR, Ringler DJ. Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am J Pathol.* 1997 Nov;151(5):1341-51.
- Rowe A, Obeiro J, Newbold CI, Marsh K. *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect Immun.* 1995 Jun;63(6):2323-6.
- Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, Dong T, Gotch F, McAdam S, Whitby D, Sabally S, Gallimore A, Corrah T, et al. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med.* 1995 Jan;1(1):59-64.
- Rubbert A, Ostrowski M, Altfeld M, Behrens G, Schieferstein C, Schmidt RE, Walker BD, Wolf E. *HIV Medicine* 2003. Paris : Flying Publisher, 2003. -352 pages.
- Rucker J, Edinger AL, Sharron M, Samson M, Lee B, Berson JF, Yi Y, Margulies B, Collman RG, Doranz BJ, Parmentier M, Doms RW. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol.* 1997 Dec;71(12):8999-9007.
- Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SN, Kwiatkowski D, Gupta S, Warn P, Allsopp CE, Gilbert SC, Peschu N, et al. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature.* 1995 Jul 20;376(6537):246-9.
- Saag MS, Hammer SM, Lange JM. Pathogenicity and diversity of HIV and implications for clinical management: a review. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994;7 Suppl 2:S2-10; discussion S10-1.
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyltermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature.* 1996 Aug 22;382(6593):722-5.
- Santianont R, Wilairat P. Red cells containing hemoglobin E do not inhibit malaria parasite development in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1981 May;30(3):541-3.
- Sarabia VE, Casey JR, Reithmeier RA. Molecular characterization of the band 3 protein from Southeast Asian ovalocytes. *J Biol Chem.* 1993 May 15;268(14):10676-80.
- Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, Fredriksson R, Colognesi C, Deng HK, Malnati MS, Plebani A, Siccardi AG, Littman DR, Fenyo EM, Lusso P. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med.* 1997 Nov;3(11):1259-65.
- Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med.* 1996 Aug 15;125(4):257-64.
- Schaible UE, Kaufmann SH. CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin Immunol.* 2000 Dec;12(6):527-35.

- Scherf A, Hernandez-Rivas R, Buffet P, Bottius E, Benatar C, Pouvelle B, Gysin J, Lanzer M. Antigenic variation in malaria: in situ switching, relaxed and mutually exclusive transcription of var genes during intra-erythrocytic development in *Plasmodium falciparum*. *EMBO J*. 1998 Sep 15;17(18):5418-26.
- Schinkel J, Langendam MW, Coutinho RA, Krol A, Brouwer M, Schuitemaker H. No evidence for an effect of the CCR5 delta32/+ and CCR2b 64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users. *J Infect Dis*. 1999 Apr;179(4):825-31.
- Schmidtmyerova H, Nottet HS, Nuovo G, Raabe T, Flanagan CR, Dubrovsky L, Gendelman HE, Cerami A, Bukrinsky M, Sherry B. Human immunodeficiency virus type 1 infection alters chemokine beta peptide expression in human monocytes: implications for recruitment of leukocytes into brain and lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 23;93(2):700-4.
- Schofield L, Hackett F. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med*. 1993 Jan 1;177(1):145-53.
- Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*. 2002 Aug 15;418(6899):785-9.
- Schofield L, McConville MJ, Hansen D, Campbell AS, Fraser-Reid B, Grusby MJ, Tachado SD. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science*. 1999 Jan 8;283(5399):225-9.
- Schofield L, Novakovic S, Gerold P, Schwarz RT, McConville MJ, Tachado SD. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol*. 1996 Mar 1;156(5):1886-96.
- Schofield L, Vivas L, Hackett F, Gerold P, Schwarz RT, Tachado S. Neutralizing monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol, the dominant TNF-alpha-inducing toxin of *Plasmodium falciparum*: prospects for the immunotherapy of severe malaria. *Ann Trop Med Parasitol*. 1993 Dec;87(6):617-26.
- Seguin MC, Klotz FW, Schneider I, Weir JP, Goodbary M, Slayter M, Raney JJ, Aniagolu JU, Green SJ. Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated *Plasmodium berghei* infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):353-8.
- Sergent E, Parrot L, Donatien A. Une question de terminologie: immuniser et prémunir. *Bull Soc Pathol Exot*. 1924;17:37-38.
- Shamshiev A, Donda A, Carena I, Mori L, Kappos L, De Libero G. Self glycolipids as T-cell autoantigens. *Eur J Immunol*. 1999 May;29(5):1667-75.
- Shamshiev A, Gober HJ, Donda A, Mazorra Z, Mori L, De Libero G. Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules. *J Exp Med*. 2002 Apr 15;195(8):1013-21.
- Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, O'Brien TR, Vlahov D, Buchbinder S, Giorgi J, Rinaldo C, Donfield S, Willoughby A, O'Brien SJ, Smith MW. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14467-72.
- Simon F, Maucelere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med*. 1998 Sep;4(9):1032-7.
- Simon F, Souquiere S, Damond F, Kfutwah A, Makuwa M, Leroy E, Rouquet P, Berthier JL, Rigoulet J, Lecu A, Telfer PT, Pandrea I, Plantier JC, Barre-Sinoussi F, Roques P, Muller-Trutwin MC, Apetrei C. Synthetic peptide strategy for the detection of and discrimination among highly divergent primate lentiviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2001 Jul 1;17(10):937-52.
- Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, Pinches R, Newbold CI, Miller LH. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell*. 1995 Jul 14;82(1):101-10.
- Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ. Contrasting genetic

influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science*. 1997 Aug 15;277(5328):959-65.

Smith T, Felger I, Tanner M, Beck HP. Premunition in *Plasmodium falciparum* infection: insights from the epidemiology of multiple infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999 Feb;93 Suppl 1:59-64.

Sodeinde O, Clarke JL, Vulliamy TJ, Luzzatto L, Mason PJ. Expression of *Plasmodium falciparum* G6PD-6PGL in laboratory parasites and in patient isolates in G6PD-deficient and normal Nigerian children. *Br J Haematol*. 2003 Aug;122(4):662-8.

Soe-Soe, Khin-Saw-Aye, Htay-Aung, Nay-Win, Tin-Aung, Than-Swe, Roussilhon C, Perignon JL, Druilhe P. Premunition against *Plasmodium falciparum* in a malaria hyperendemic village in Myanmar. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001 Jan-Feb;95(1):81-4.

Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melian A, Leslie DS, Lee HK, van Donselaar E, Hanson DA, Krensky AM, Majdic O, Porcelli SA, Morita CT, Brenner MB. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med*. 2000 Mar 20;191(6):937-48.

Spitsin SV, Koprowski H, Michaels FH. Characterization and functional analysis of the human inducible nitric oxide synthase gene promoter. *Mol Med*. 1996 Mar;2(2):226-35.

Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, Sette A, Brenner MB, Porcelli SA, Bloom BR, Modlin RL. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*. 1997 Jun 13;276(5319):1684-7.

Stephens JWW. A new malaria parasite of man. *Ann Trop Med Parasitol*. 1922;16:383-6.

Stirnadel HA, Stockle M, Felger I, Smith T, Tanner M, Beck HP. Malaria infection and morbidity in infants in relation to genetic polymorphisms in Tanzania. *Trop Med Int Health*. 1999 Mar;4(3):187-93.

Storey J, Fleming AF, Cornille-Brogger R, Molineaux L, Matsushima T, Kagan I. Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. IV. Malaria, immunoglobulins and antimalarial antibodies in haemoglobin AC individuals. *Ann Trop Med Parasitol*. 1979 Aug;73(4):311-5.

Sullivan BL, Knopoff EJ, Saifuddin M, Takefman DM, Saarloos MN, Sha BE, Spear GT. Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo. *J Immunol*. 1996 Aug 15;157(4):1791-8.

Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, Summerfield JA. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet*. 1991 Jun 29;337(8757):1569-70.

Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet*. 1989 Nov 25;2(8674):1236-9.

Tachado SD, Gerold P, McConville MJ, Baldwin T, Quilici D, Schwarz RT, Schofield L. Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Immunol*. 1996 Mar 1;156(5):1897-1907.

Tang J, Costello C, Keet IP, Rivers C, Leblanc S, Karita E, Allen S, Kaslow RA. HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1999 Mar 1;15(4):317-24.

Tang J, Rivers C, Karita E, Costello C, Allen S, Fultz PN, Schoenbaum EE, Kaslow RA. Allelic variants of human beta-chemokine receptor 5 (CCR5) promoter: evolutionary relationships and predictable associations with HIV-1 disease progression. *Genes Immun*. 1999 Sep;1(1):20-7.

Than S, Hu R, Oyaizu N, Romano J, Wang X, Sheikh S, Pahwa S. Cytokine pattern in relation to disease progression in human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis*. 1997 Jan;175(1):47-56.

Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, Katlama C, Rouzioux C. HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group. *Lancet*. 1997 Apr 26;349(9060):1219-20.

- Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis*. 2002 Aug;2(8):461-71.
- Tishkoff SA, Varkonyi R, Cahinhinan N, Abbes S, Argyropoulos G, Destro-Bisol G, Drousiotou A, Dangerfield B, Lefranc G, Loiselet J, Piro A, Stoneking M, Tagarelli A, Tagarelli G, Touma EH, Williams SM, Clark AG. Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science*. 2001 Jul 20;293(5529):455-62. Epub 2001 Jun 21.
- Trape JF, Lefebvre-Zante E, Legros F, Ndiaye G, Bouganali H, Druilhe P, Salem G. Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. *Am J Trop Med Hyg*. 1992 Aug;47(2):181-9.
- Tsujimoto H, Cooper RW, Kodama T, Fukasawa M, Miura T, Ohta Y, Ishikawa K, Nakai M, Frost E, Roelants GE, et al. Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus from mandrills in Africa and its relationship to other human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol*. 1988 Nov;62(11):4044-50.
- Turner GD, Morrison H, Jones M, Davis TM, Looareesuwan S, Buley ID, Gatter KC, Newbold CI, Pukritayakamee S, Nagachinta B, et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol*. 1994 Nov;145(5):1057-69.
- Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet*. 2000;2(3):305-22.
- Turner MW. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today*. 1996 Nov;17(11):532-40.
- Udomsangpetch R, Sueblinvong T, Pattanapanyasat K, Dharmkrong-at A, Kittikalayawong A, Webster HK. Alteration in cytoadherence and rosetting of Plasmodium falciparum-infected thalassemic red blood cells. *Blood*. 1993 Dec 15;82(12):3752-9.
- Udomsangpetch R, Todd J, Carlson J, Greenwood BM. The effects of hemoglobin genotype and ABO blood group on the formation of rosettes by Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Feb;48(2):149-53.
- Usanga EA, Luzzatto L. Adaptation of Plasmodium falciparum to glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient host red cells by production of parasite-encoded enzyme. *Nature*. 1985 Feb 28-Mar 6;313(6005):793-5.
- Valdez H, Purvis SF, Lederman MM, Fillingame M, Zimmerman PA. Association of the CCR5delta32 mutation with improved response to antiretroviral therapy. *JAMA*. 1999 Aug 25;282(8):734.
- Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A, Pavlakis GN. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8886-91.
- Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol*. 2000 Nov;74(22):10498-507.
- Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA. Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *J Virol*. 1998 Sep;72(9):7642-7.
- Wattavidanage J, Carter R, Perera KL, Munasingha A, Bandara S, McGuinness D, Wickramasinghe AR, Alles HK, Mendis KN, Premawansa S. TNFalpha*2 marks high risk of severe disease during Plasmodium falciparum malaria and other infections in Sri Lankans. *Clin Exp Immunol*. 1999 Feb;115(2):350-5.
- Weatherall DJ. Host genetics and infectious disease. *Parasitology*. 1996;112 Suppl:S23-9.
- Weiss G, Thuma PE, Biemba G, Mabeza G, Werner ER, Gordeuk VR. Cerebrospinal fluid levels of biopterin, nitric oxide metabolites, and immune activation markers and the clinical course of human cerebral malaria. *J Infect Dis*. 1998 Apr;177(4):1064-8.

White NJ, Chapman D, Watt G. The effects of multiplication and synchronicity on the vascular distribution of parasites in falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 Nov-Dec;86(6):590-7.

Williams TN, Maitland K, Bennett S, Ganczakowski M, Peto TE, Newbold CI, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB. High incidence of malaria in alpha-thalassaemic children. *Nature.* 1996 Oct 10;383(6600):522-5.

Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet.* 1992 Aug;1(5):353.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 1;94(7):3195-9.

Wood CS. Preferential feeding of *Anopheles gambiae* mosquitoes on human subjects of blood group O: A relationship between the ABO polymorphism and malaria vectors. *Hum Biol.* 1974 Sep;46(3):385-404.

Xu W, Westwood B, Bartsocas CS, Malcorra-Azpiazu JJ, Indrak K, Beutler E. Glucose-6 phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood.* 1995 Jan 1;85(1):257-63.

Yu XF, Wang Z, Vlahov D, Markham RB, Farzadegan H, Margolick JB. Infection with dual-tropic human immunodeficiency virus type 1 variants associated with rapid total T cell decline and disease progression in injection drug users. *J Infect Dis.* 1998 Aug;178(2):388-96.

Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature.* 1998 Feb 5;391(6667):594-7.

Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, Weissman D, Cohen O, Rubbert A, Lam G, Vaccarezza M, Kennedy PE, Kumaraswami V, Giorgi JV, Detels R, Hunter J, Chopek M, Berger EA, Fauci AS, Nutman TB, Murphy PM. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med.* 1997 Jan;3(1):23-36.

Zimmerman PA, Guderian RH, Nutman TB. A new TNFA promoter allele identified in South American Blacks. *Immunogenetics.* 1996;44(6):485-6.

Références Electroniques:

The Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria; Site web globalfundatm.org

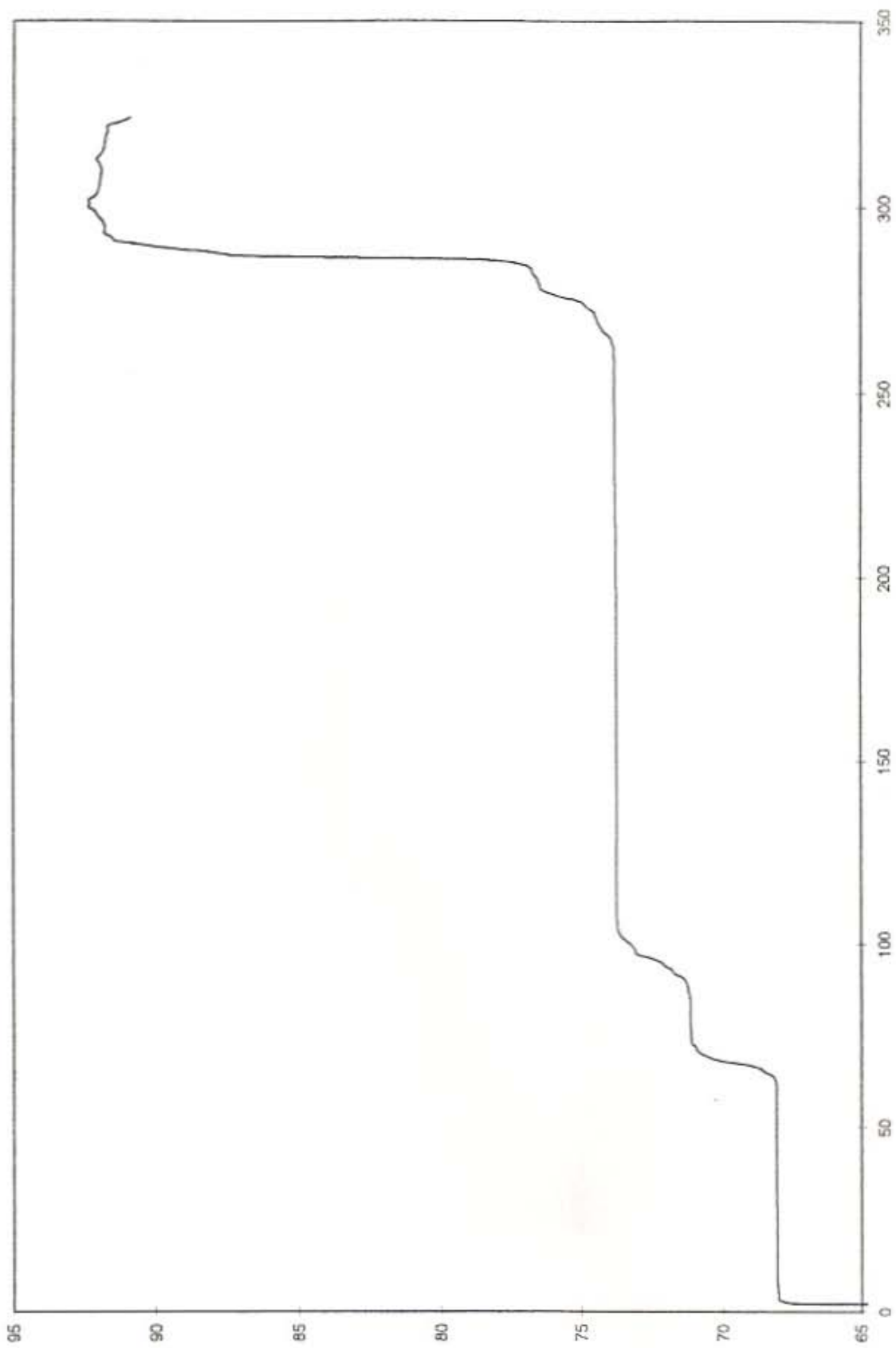
Organisation Mondiale de la Santé; Paludisme aide-mémoire; Site web who.int

ONUSIDA; Le point sur l'épidémie de SIDA, décembre 2002; Site web unaids.org

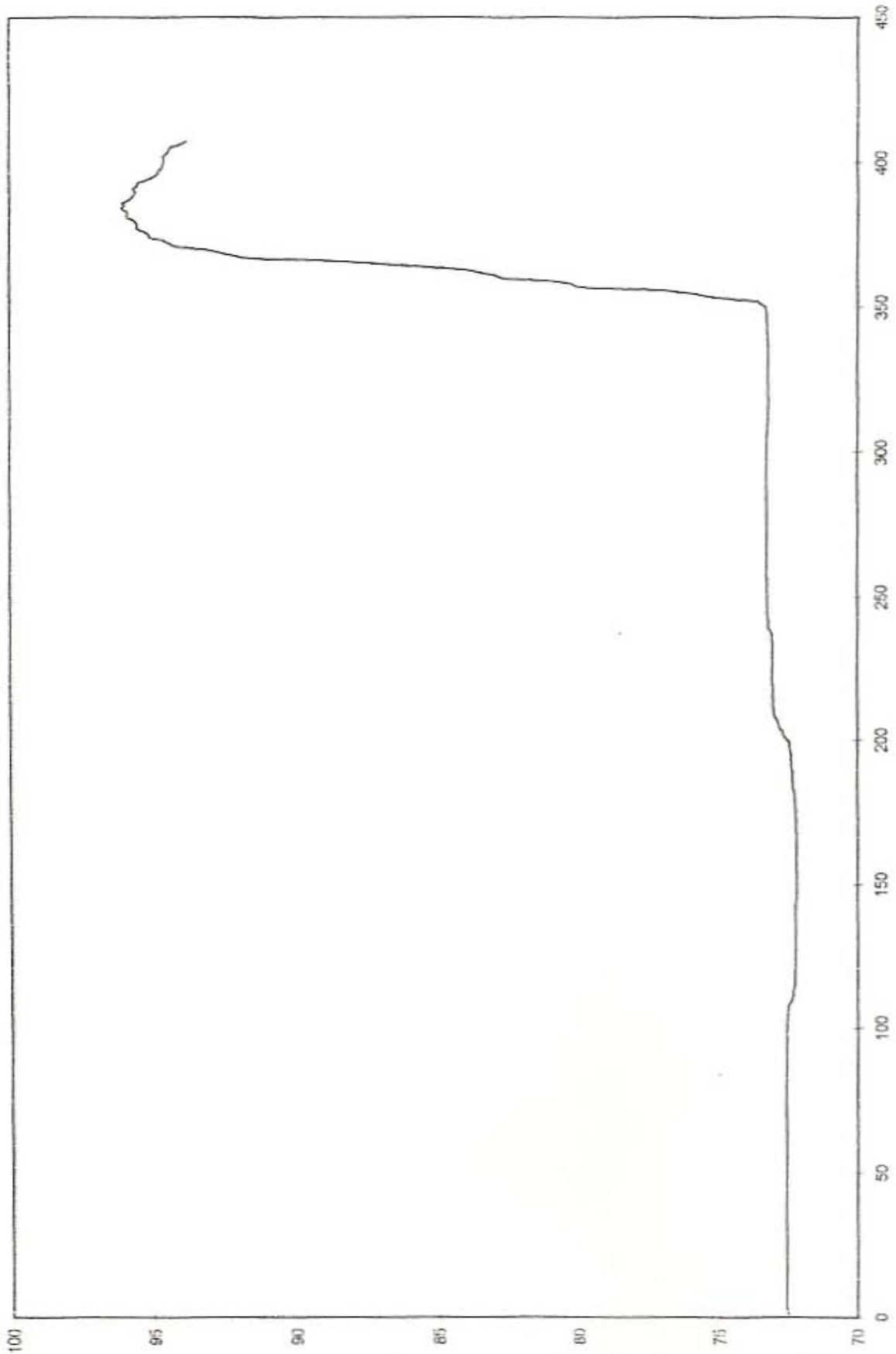
Programme Roll Back Malaria-RBM; Site web rbm.who.int

Fondation Medicines for Malaria Venture; Site web mmv.org

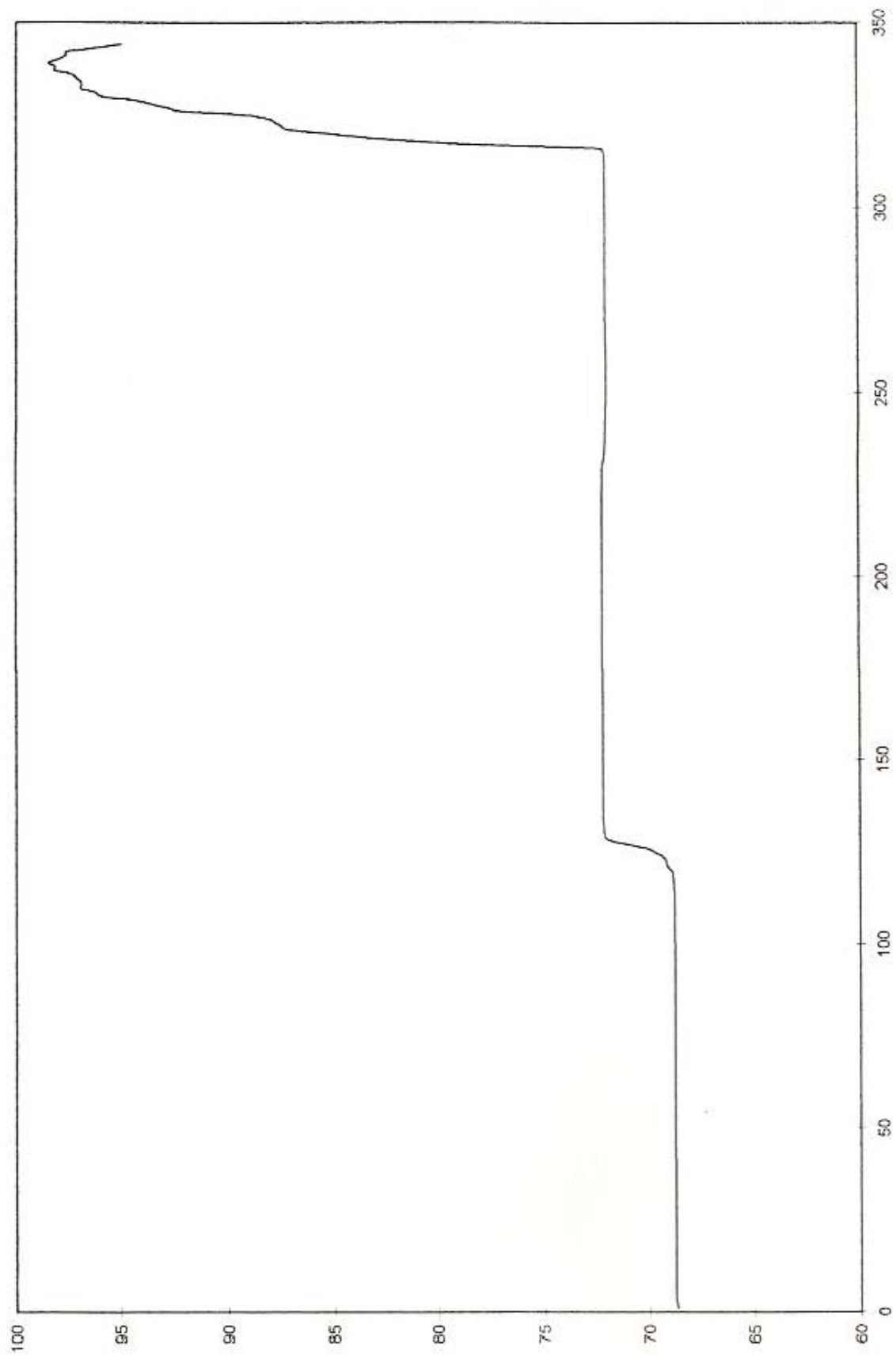
ANNEXES



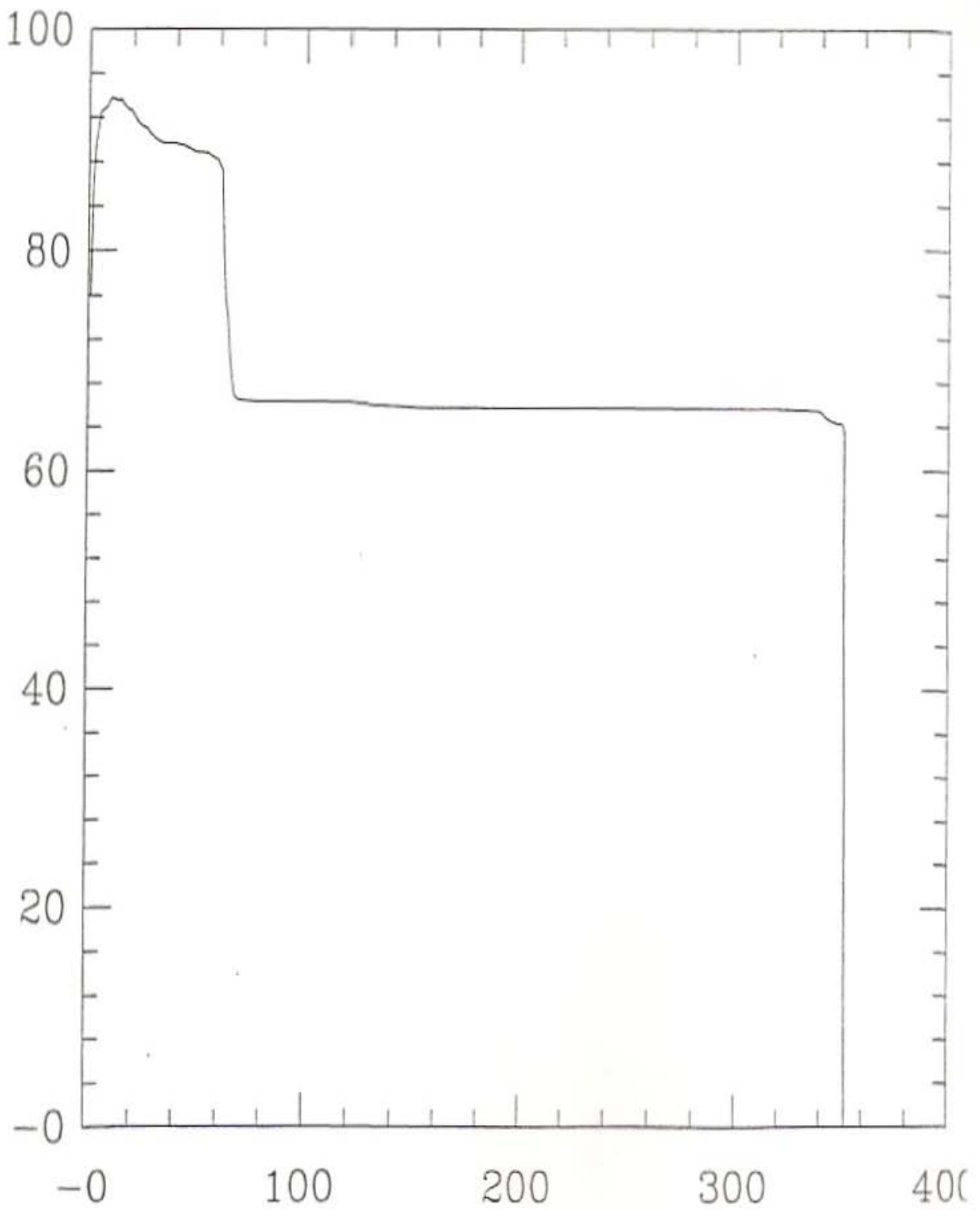
Annexe 1 : Courbe de fusion de l'exploration par la DGGE du 1^{er} fragment amplifié



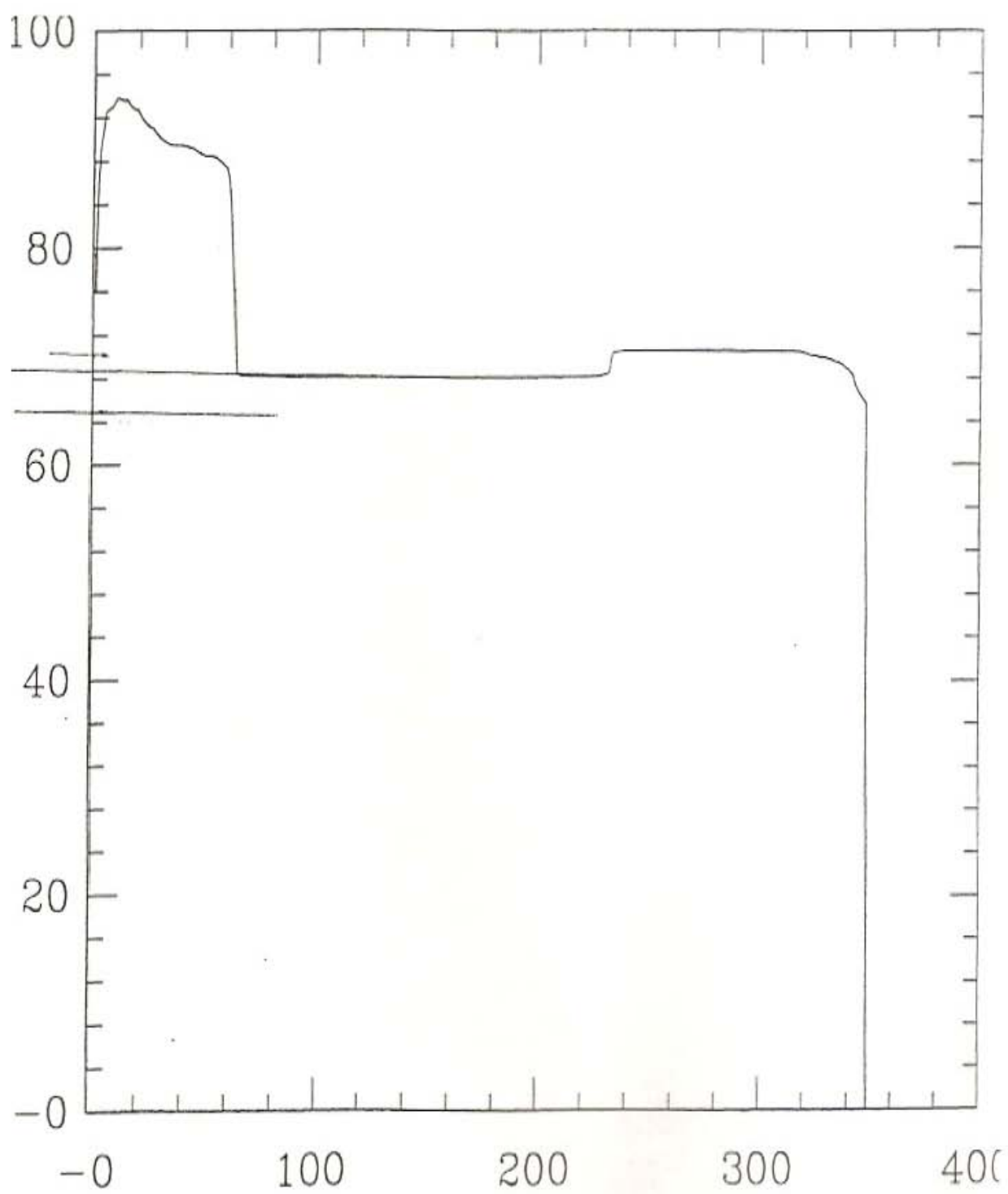
Annexe 2 : Courbe de fusion de l'exploration par la DGGE du 2^{ème} fragment amplifié



Annexe 3 : Courbe de fusion de l'exploration par la DGGE du 3^{ème} fragment amplifié



Annexe 4 : Courbe de fusion de l'exploration par la DGGE du 4^{ème} fragment amplifié



Annexe 5 : Courbe de fusion de l'exploration par la DGGE du 5^{ème} fragment amplifié



Annexe 6 : Carte géographique du Gabon [Extraite du site web izf.net]

Résumé :

Les facteurs génétiques de l'hôte font partie des déterminants impliqués dans la pathogenèse d'une infection. L'Afrique Centrale est la région la plus touchée par le paludisme et le SIDA, mais elle présente des données fragmentaires sur la génétique de l'hôte.

Les objectifs de cette étude sont :

- de contribuer, dans les populations d'Afrique Centrale, à la définition de marqueurs génétiques (loci G6PD, TNF- α , CD1, MBL et CCR5)
- d'analyser ces polymorphismes génétiques en relation avec soit les infections à *Plasmodium falciparum* (asymptomatique et simple), soit l'infection à HIV-1.

A la suite d'études d'associations, nous avons obtenu les résultats suivants :

- Les individus hétérozygotes pour l'allèle G6PD-A⁻, possèdent une résistance aux infections palustres aussi bien asymptomatique que simple. Par contre, les sujets hémizygotés n'en sont pas pourvus.
- Les associations entre l'allèle TNF- α -238A (à l'état hétérozygote) et un nombre élevé de génotypes parasitaires, ainsi qu'entre ce même allèle et un titre élevé d'anticorps anti-palustres, mettent à jour l'un des mécanismes de protection contre l'infection palustre de cet allèle.
- L'association entre l'allèle CD1-E02 à l'état homozygote et la résistance aux accès simple de paludisme, a permis d'évoquer pour la première fois, l'implication de la molécule CD1E dans l'immunité anti-palustre.
- Les sujets homozygotes ou hétérozygotes composites pour l'allèle MBL-G57E, présentent un risque élevé d'infection à HIV-1. Par contre, les individus hétérozygotes pour ce même allèle, semblent développer une résistance contre l'infection HIV-1 mais également contre la tuberculose.
- Enfin l'allèle CCR5-P_D03 à l'état homozygote est associé à une susceptibilité accrue à l'infection à HIV-1. Cette susceptibilité serait restreinte aux populations noires et cet allèle serait originaire d'Afrique Centrale.

Title :

Human genetic polymorphism (G6PD, TNF- α , CD1, MBL and CCR5 loci) in relation with susceptibility/resistance to *Plasmodium falciparum* malaria and HIV-1 infection in Central Africa (Gabon)

Abstract :

Host genetic factors are one of the determinants involved in the pathogenesis of infections. Central Africa is endemic for malaria and highly affected by AIDS but there is paucity of data concerning host genetic factors.

The objectives of this study are :

- to contribute to the definition of host genetic polymorphism of G6PD, TNF- α , CD1, MBL and CCR5 loci in populations from Central Africa
- to analyse the genetic association in relation with *Plasmodium falciparum* (asymptomatic and mild) and HIV-1 infections.

Our data show that :

- individuals heterozygous for G6PD-A⁻ allele are resistant to both *P. falciparum* asymptomatic and mild infections while hemizygous status for the same allele do not confer protection.
- associations of TNF- α -238A allele (in heterozygous state) both with high number parasitic genotypes and with high levels of antibody directed against plasmodies, provide one of the protective mechanisms of this allele against malaria.
- association between CD1-E02 allele in homozygous state and resistance against malarial attacks, has pointed out for the first time, potential implication of CD1E molecules in malarial immunity.
- subjects homozygous or compound heterozygous for MBL-G57E allele, have a high risk of HIV-1 infection while individuals heterozygous for the same allele seem to develop resistance to HIV-1 infection and also to tuberculosis.
- The CCR5-P_D03 allele, apparently of Central African origin, in homozygous state is associated with susceptibility to HIV-1 infection. This susceptibility seems to be restricted to Black populations.

Spécialité : Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire

Mots-clés : Polymorphisme génétique, G6PD, TNF- α , CD1, MBL, CCR5, *Plasmodium falciparum*, HIV-1.

Adresse du laboratoire :

INSERM U458, Hôpital Robert Debré, 48 Boulevard Sérurier, 75019, Paris (France) et Centre International de Recherches Médicales de Franceville, BP 769, Franceville (Gabon).