

PARASITOLOGIE

Polymorphisme allélique du gène MSP-2 de *Plasmodium falciparum* analysé à partir d'échantillons sanguins d'enfants gabonais.

F. Ntoumi^a, J. Ngoundou-Landji, A. J. F. Luty^b, G. Dubreuil^c & P. Millet^d

Centre international de recherches médicales (CIRMF). B.P. 769, Franceville, Gabon. Tél : (241)-67-71-32 Fax : (241)-67-72-95. E-mail : fntoumi@hotmail.com

^a Adresse actuelle : Hôpital Albert Schweitzer, Unité de recherches, BP118, Lambaréné, Gabon.

^b Adresse actuelle : Institut für Tropenmedizin, Wilhelmstrasse 27, Tübingen, Allemagne.

^c Adresse actuelle : CNRS, 31 chemin Joseph Aiguier - 13402 Marseille cedex 20, France.

^d Adresse actuelle : Centre René Labusquière, Université Victor Segalen Bordeaux II, 146 rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

Manuscrit n°2151. "Parasitologie". Reçu le 19 janvier 2000. Accepté le 25 juillet 2000.

Summary: Allelic polymorphism of *Plasmodium falciparum* MSP-2 gene in isolates from Gabonese children.

In this study, we have undertaken the molecular analysis of the MSP-2 gene of P. falciparum isolates collected from schoolchildren living in the village of Dienga (Gabon). Using conventional microscopy and the polymerase chain reaction, 61% of these children harboured parasites without any symptom of malaria (asymptomatic status). Children with a malaria episode were those with an axillary temperature 37°5 C and a parasitaemia 800 parasites/μl of blood. Comparisons of the allelic diversity and distribution of MSP-2 gene were carried out according to the clinical status at the time of sampling.

Polymorphism of the MSP-2 gene was large in both clinical groups, both asymptomatic and symptomatic (11 identified alleles). The allele FC27/560bp (base pairs) was found significantly in clinical isolates. Prevalence of the 3D7 family was 68% and 44% in asymptomatic infections and clinical infections, respectively. Multiple P. falciparum genotypes were more predominant in clinical cases (2.96 clones/child with a malaria attack vs 2.01 clones/child with asymptomatic infections). We observed also a reduction of the complexity of infection beyond the age of 10 years. These results are discussed in regard to studies conducted in other areas in Africa.

Résumé :

Dans cette étude, nous avons entrepris l'analyse moléculaire des souches de P. falciparum prélevées chez les enfants scolarisés du village de Dienga au Gabon. Dans cette population, 61 % des enfants portent ce parasite sans manifester de symptômes (statut asymptomatique); ceci a été mis en évidence par microscopie conventionnelle ou par l'amplification enzymatique du gène MSP-2 de P. falciparum. Les enfants malades du paludisme sont ceux qui ont une température axillaire 37°5C et une parasitémie 800 parasites/μl de sang. Une comparaison de la diversité et de la distribution des allèles de MSP-2 a été entreprise en fonction du statut clinique au moment du prélèvement.

Le polymorphisme du gène de MSP-2 est large et tout aussi important dans les isolats des enfants malades que dans ceux des enfants asymptomatiques (11 allèles ont été identifiés sur l'ensemble des isolats). Nous remarquons que l'allèle FC27/560 pb (paires de bases) est sur-représenté dans les isolats cliniques. La fréquence de la famille allélique 3D7 est de 68 % dans les isolats provenant des infections asymptomatiques et de 44 % dans les isolats cliniques. Les infections multiples à P. falciparum sont plus nombreuses dans les isolats cliniques (2.96 clones/enfant malade vs 2.01 clones/enfant asymptomatique) et nous observons une réduction de cette complexité passé l'âge de 10 ans. Ces résultats sont discutés en regard des études menées sur d'autres sites en Afrique.

**P. falciparum
merozoïte surface protein 2 (MSP-2)
genotyping
asymptomatic
symptomatic
Dienga
Gabon
Sub-Saharan Africa**

**P. falciparum
merozoïte surface protein 2 (MSP-2)
génotypage
statut clinique
Dienga
Gabon
Afrique intertropicale**

Introduction

Le paludisme est la première cause de morbidité et de mortalité dans les régions sub-sahariennes de l'Afrique. *Plasmodium falciparum* est l'espèce la plus redoutable car responsable de la plupart des cas mortels. L'adaptation de ces parasites aux changements de l'environnement, à la pression médicamenteuse, aussi bien qu'aux réponses immunes de l'hôte, leur a permis de déjouer les programmes de contrôle de la maladie. Parmi les mesures mises en œuvre pour élimi-

ner ce parasite, la vaccination contre le paludisme est un grand espoir, tempéré toutefois par le fait que *Plasmodium falciparum* est une espèce extrêmement polymorphe (22). L'existence de cette grande diversité antigénique entre les souches de *P. falciparum* est l'une des hypothèses avancées pour expliquer aussi bien la lente acquisition de l'immunité contre le paludisme des individus vivant en zone d'endémie palustre, que pour expliquer la susceptibilité marquée des adultes européens voyageant dans ces mêmes zones (12).

De nombreuses études d'épidémiologie moléculaire des parasites ont montré que les populations parasitaires sont différentes en fonction du site et, sur un même site, elles peuvent être différentes en fonction de la saison de transmission (2, 3, 17) ou en fonction des facteurs dépendant de l'hôte tels que l'hémoglobine (14, 15). L'analyse comparative de la diversité génétique des parasites prélevés chez des sujets porteurs asymptomatiques (4, 10) et symptomatiques (4, 17, 19) a permis de considérer la multiplicité des infections comme un critère important dans l'analyse des infections dues au paludisme pour un site donné. En effet, les individus résidant en zone d'endémie paludique hébergent une à plusieurs souches en même temps, ce nombre pouvant varier de 1 à 7 (15, 16). La présence d'infections comportant de multiples clones parasitaires a été mise en évidence dans des isolats provenant de plusieurs pays comme la Gambie (6), le Soudan (2, 3), la Tanzanie (4), le Zimbabwe (7). Une faible prévalence des infections multiples dans les prélèvements sanguins a été associée à la sévérité de la maladie au Sénégal (16) et, en Papouasie-Nouvelle-Guinée, à une plus grande morbidité paludique (1).

Dans un village situé au sud-est du Gabon, le village de Dienga, nous avons entrepris l'analyse moléculaire des souches de *Plasmodium falciparum* prélevées chez des enfants scolarisés. Le but de cette étude était de caractériser et de comparer la diversité génétique, la distribution allélique aussi bien que la complexité des infections dans les isolats provenant d'une population stable. Cette comparaison a été faite en fonction du statut clinique: porteurs sains de parasites et porteurs symptomatiques. Les prélèvements ont été réalisés pendant la même période de transmission.

Nous avons utilisé comme marqueur génétique du polymorphisme du parasite le gène MSP-2 (mérozoïte surface protéine 2) qui code pour une protéine qui est aussi un candidat vaccin. Ce marqueur s'est révélé utile et fiable dans plusieurs études de suivi des infections au niveau de l'individu ou de la population.

Les données obtenues dans cette étude pourront servir de référence pour de futures études telles que l'impact des différents essais thérapeutiques sur les populations parasitaires.

Matériels et méthodes

Site de l'étude

Cette étude a été menée dans le village de Dienga (au sud-est du Gabon) où la majorité des infections à *P. falciparum* ont lieu pendant les saisons des pluies, de février à mai et d'octobre à décembre. Environ 1200 personnes vivent dans ce village et *P. falciparum* est l'espèce plasmodiale prédominante, constituant plus de 95 % de toutes les infections observées en microscopie conventionnelle. Ce village est situé dans une région où le paludisme est mésoendémique et hyperendémique et des pics saisonniers de transmission sont observés pendant la saison des pluies. Les vecteurs les plus importants sont *Anopheles gambiae* et *Anopheles hancocki*. Le taux d'inoculation entomologique est estimé à 0,27 piqûre infectante/homme/nuît pendant cette période de prélèvement (N. ELISSA, communication personnelle).

Les patients

Les sujets inclus dans cette étude sont âgés de 7 à 14 ans et sont scolarisés dans l'école primaire du village. Ils ont tous été recrutés pendant la même période, de février à mai 1995. Les enfants asymptomatiques ont été recrutés à l'école tandis que

les sujets symptomatiques l'ont été au dispensaire du village ou par recherche active de l'élève absent. La température axillaire a été prise, et une goutte épaisse et un frottis ont été réalisés pour déterminer la parasitémie et l'espèce infectante. Dans cette étude, un enfant est déclaré souffrir de paludisme s'il a une température axillaire supérieure à 37,5 °C et une densité parasitaire supérieure à 800 parasites/ μ l de sang (21). La présence d'antimalariques dans les urines a été recherchée en utilisant le test de SAKER-SOLOMON (18). Tous les enfants malades ont été traités en administrant de la quinine (8 mg base/kg) et de la clindamycine (8mg/kg) par voie orale 2 fois par jour pendant 3 jours. Des gouttes épaisses ont été faites à J0, J4 et J7 après traitement (21). Seuls les enfants guéris à la suite du traitement ont été retenus dans cette étude. Le sang veineux a été prélevé avec le consentement informé des parents ou des tuteurs. Le culot globulaire a été obtenu après centrifugation et retrait des cellules mononucléées. Ce culot a été congelé à -80 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN parasitaire. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du Centre international de recherches médicales de Franceville (CIRMF).

Méthode d'observation des parasites

Dans cette étude, seules les formes sanguines asexuées sont considérées. Après coloration au Giemsa, les parasites sont comptés sur 200 leucocytes et les densités parasitaires (nombre de parasites par μ l de sang) sont déterminées en considérant que l'on a 8000 leucocytes / μ l de sang.

Typage du gène MSP-2

Les allèles de la protéine 2 de surface du mérozoïte sont groupés en 2 familles principales 3D7 et FC27, correspondant à la structure dimorphique de la région centrale variable (16). Les allèles de MSP-2 sont typés par la double amplification enzymatique spécifique en utilisant des amorces spécifiques des familles alléliques de MSP-2 décrites précédemment (14, 15). Les amorces utilisées flanquent la région centrale de ce gène. Les fragments amplifiés (produits PCR) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 % (Seakem, FMC products) et visualisés grâce au bromure d'éthidium sous ultraviolet. La taille des fragments a été déterminée en utilisant des marqueurs de poids moléculaire (Boehringer Mannheim, Marker VI).

Statistiques

La population concernée est la population parasitaire, l'unité statistique est l'allèle et les variables étudiées sont les différents allèles (présent ou absent) caractérisés par leur séquence (famille 3D7 ou famille FC27) et par leur taille. La fréquence d'un allèle est exprimée simplement en pourcentage comme étant le rapport du nombre d'allèles X observés sur l'ensemble des allèles dénombrés dans les isolats. Les techniques d'amplification utilisées ici identifient les allèles qualitativement.

L'homogénéité de l'âge dans chaque groupe a été testée aussi en utilisant le test de MANN-WHITNEY U.

L'impact de l'âge sur le nombre total de fragments ou de génotypes parasitaires différents et sur la parasitémie a été analysé en utilisant le test de corrélation de SPEARMAN. Il en a été de même pour l'analyse de la relation entre la densité parasitaire et le nombre total de fragments. Le test du χ^2 a été utilisé pour comparer le nombre total de clones observé entre les deux groupes cliniques. La fréquence allélique de FC27 et 3D7 entre les deux groupes cliniques a été comparée en utilisant le test de MANN-WHITNEY U.

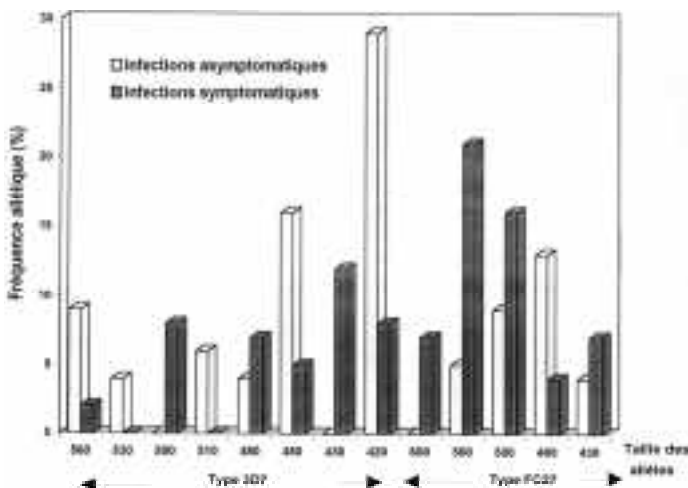
Résultats

Pendant la période de recrutement, de février à mai 1995, cent soixante-trois enfants dont 76 filles et 87 garçons, âgés de 6 à 14 ans, ne présentant pas de symptômes du paludisme, ont été prélevés. Soixante et un enfants avaient moins de 10 ans et cent deux enfants avaient 10 ans ou plus. Parmi eux, soixante et un pour cent étaient infectés par *P. falciparum* (mis en évidence sur goutte épaisse ou lors de l'amplification enzymatique de l'ADN parasitaire). D'autre part, vingt-six enfants âgés de 6 à 14 ans, dont 11 avaient moins de 10 ans et 15 avaient 10 ans ou plus, souffrant de paludisme simple avec une température axillaire supérieure à 37,5 °C et une densité parasitaire de *P. falciparum* comprise entre 800 et 56000 parasites/µl de sang, ont également été recrutés. L'âge moyen des enfants porteurs asymptomatiques de parasites était de 10,38 (déviations standard 2,04) et celui des enfants malades était de 10,6 (déviations standard 2,4). Aucune trace d'antimalarique n'a été détectée dans les urines au moment des prélèvements. La moyenne géométrique de la densité parasitaire chez ces enfants malades était de 3712 (820 - 40000 parasites/µl de sang) et, chez les porteurs sains, elle était de 215 (60 - 6760 parasites/µl de sang).

La sensibilité de la technique de génotypage dans nos mains a été déterminée en utilisant la souche SGE2 cultivée au laboratoire. Elle est de 1 parasite détecté/µl de sang. Certains échantillons ont été choisis au hasard et testés de manière répétée afin de vérifier la reproductibilité de notre technique. Le typage du gène MSP-2 a mis en évidence un polymorphisme large; en effet, 11 allèles du gène de MSP-2 ont été détectés dans 126 isolats. Tous ces allèles ont été distingués par la taille des fragments amplifiés et/ou la famille allélique 3D7 ou FC27. Six allèles de type 3D7 et cinq allèles de type FC27 ont été dénombrés (figure 1). En fonction du statut clinique, nous observons que l'allèle FC27/600 pb n'est mis en évidence que dans les infections symptomatiques et les allèles 3D7/530 pb et 3D7/510 bp ne sont présents que dans les infections asymptomatiques, mais la très faible fréquence, environ 4 %, ne permet ni déduction ni spéculation. L'allèle 3D7/420 bp est significativement sur-représenté dans les infections asymptomatiques. Par contre, les allèles FC27 de 560 pb et de 500 pb sont sur-représentés dans les infections symptomatiques (P < 0,05) (figure 1).

Figure 1.

Diversité allélique du gène MSP-2 de Plasmodium falciparum dans les prélèvements des enfants du village de Dienga, Gabon.
Allelic diversity of Plasmodium falciparum MSP-2 gene in samples from children living in the village of Dienga, Gabon.



La fréquence de la famille allélique 3D7 est de 68 % dans les infections asymptomatiques et 44 % dans les symptomatiques. Nous mettons en évidence une différence significative (p < 0,0002, MANN-WHITNEY U) dans la proportion des allèles 3D7 en fonction du statut clinique. Les infections symptomatiques comportent significativement moins d'allèles de la famille 3D7 tandis que la famille FC27 est prédominante (56 % contre 32 % dans les infections asymptomatiques). Mais cette dernière différence n'est pas significative.

Les infections multiples sont déterminées par la présence de plus d'un allèle de MSP-2 dans un seul isolat. L'utilisation du marqueur MSP-2 uniquement permet de mettre en évidence 2,96 clones par enfant malade contre 2,01 par enfant sain. Nous observons donc une complexité des infections significativement plus importante dans les isolats cliniques (test du χ^2 , p < 0,05) (tableau I).

Tableau I.

Le nombre total de fragments représente le nombre total de génotypes parasitaires détecté en utilisant l'analyse du gène MSP-2 de *P. falciparum* (P. f.), sur l'ensemble des isolats.

The total number of fragments represents the total number of parasitic genotypes detected using the analysis of Plasmodium falciparum MSP-2 gene on all the isolates.

enfants porteurs d'infections asymptomatiques	
nb sujets	100
nb total de fragments	201
nb fragments/enfant	2,01
enfants porteurs d'infections symptomatiques	
nb sujets	26
nb total de fragments	77
nb fragments/enfant	2,96

Le nombre de fragment/enfant représente le nombre de génotypes parasitaires de *P. f.* identifié en utilisant l'analyse du gène MSP-2, dans un échantillon sanguin.

Il est intéressant de noter que le nombre total de fragments ou le nombre total de génotypes parasitaires différents détectés diminue après l'âge de 10 ans dans cette population d'enfants (SPEARMAN'S rank correlation {rs = -0,42}, p < 0,05). En revanche, nous n'observons aucune corrélation entre l'âge et la densité parasitaire, ni entre la densité parasitaire et le nombre total de fragments dans ces échantillons. Pour cette dernière analyse, nous n'avons considéré que les échantillons positifs à l'examen microscopique.

Discussion

L'analyse des génotypes parasitaires fournit de nouveaux moyens pour décrire et caractériser le paludisme sur un site donné et cela permet aussi d'avoir des indications sur la mise en place de l'immunité naturelle contre *Plasmodium falciparum*. Dans l'étude présentée ici, nous avons analysé la diversité génétique des souches de *P. falciparum* prélevées chez des enfants porteurs asymptomatiques de parasites et chez d'autres souffrant de paludisme simple. Notre but était de comparer la diversité allélique, la distribution des allèles et la complexité des infections en fonction du statut clinique.

Cette étude a été menée dans le village de Dienga sur une période de 4 mois et nous estimons que la plupart des allèles du gène de MSP-2 circulant sur ce site ont pu être détectés. Cette remarque s'avère nécessaire car il a été montré en Tanzanie (10) que les populations parasitaires fluctuaient de manière quotidienne. Ce renouvellement continu des souches au niveau individuel a été observé aussi au Sénégal (8). Il est important de remarquer que le niveau de transmission sur le site tanzanien et sénégalais est 3 fois plus important que celui observé dans le village de Dienga au Gabon.

Malgré cela, un polymorphisme important du gène MSP-2 a été mis en évidence aussi bien dans les isolats cliniques que dans

les infections asymptomatiques. Cette observation n'est guère différente de celles faites sur d'autres sites en Afrique avec des niveaux d'endémicité différents (2, 4, 13, 17).

Nous observons que la répartition des allèles est différente en fonction du statut clinique puisque la famille allélique prédominante est la famille 3D7 dans les infections asymptomatiques et la famille FC27 dans les isolats des enfants malades. Les allèles FC27 ont aussi été observés en majorité chez les sujets malades de Papouasie-Nouvelle-Guinée (9); par contre c'est la famille 3D7 qui a été associée à la maladie en Tanzanie (4) et au Sénégal (16). Il est possible que ces allèles FC27 de la protéine 2 de surface du mérozoïte induisent une plus grande production des cytokines impliquées dans la cascade des événements conduisant aux symptômes, ou que ces allèles soient beaucoup plus aptes à favoriser l'invasion des globules rouges. Nous pouvons formuler l'hypothèse que les allèles 3D7 trouvés majoritairement dans les isolats des infections asymptomatiques pourraient participer à la mise en place de la protection contre la maladie et il serait alors intéressant d'analyser la réponse humorale spécifique de souche (3D7 et FC27) en fonction du statut clinique. Si le taux en anticorps contre 3D7 était trouvé plus important chez les porteurs asymptomatiques du village, cela appuierait cette hypothèse. Il serait également intéressant de déterminer la fréquence des différentes familles alléliques du gène MSA-2 dans des prélèvements sanguins d'adultes du village. Outre cette hypothèse, il n'est pas à exclure la possibilité que ce ne soit pas le locus MSP-2 qui soit responsable des résultats observés ici mais que ce soit le produit d'un locus qui lui est très proche.

La complexité des infections étant un reflet au niveau individuel de la relation hôte-parasite, il ressort de notre étude que les isolats cliniques contiennent significativement plus de souches différentes que les isolats relevant d'infections asymptomatiques. La moyenne d'âge des individus étant la même dans les deux groupes, cette augmentation ne saurait être attribuée à un biais dans le recrutement des patients. Ce résultat est intéressant et va tout à fait dans le sens des observations faites dans un village du Soudan (17) où la transmission est saisonnière et peu importante. Mais il est en contradiction avec les observations faites dans les villages sénégalais (5), tanzaniens (4) et de Papouasie-Nouvelle-Guinée (1) dans lesquels une réduction du nombre de clones est observée lors des épisodes de paludisme et où la transmission est importante et pérenne. Nous interprétons néanmoins ce résultat ainsi: la survenue des symptômes serait liée à l'inoculation d'une nouvelle souche non encore rencontrée par l'individu qui n'a donc pas développé une immunité suffisante pour contrôler sa multiplication. Ainsi, à l'apparition des symptômes du paludisme, un allèle parasitaire particulier serait présent en quantité importante. La maladie serait déclenchée par un phénomène quantitatif et non qualitatif. Dans ce travail, il nous est impossible de dire si un génotype parasitaire est présent de manière importante quantitativement dans les isolats cliniques au moment du prélèvement car la méthodologie utilisée ici pour analyser les allèles n'est pas quantitative. D'autre part, cette augmentation du nombre de clones parasitaires dans les isolats cliniques obtenus dans les villages gabonais ou soudanais (17) peut être due à une meilleure détection par amplification enzymatique de l'ADN des clones présents. En effet, la densité parasitaire chez les malades gabonais et soudanais est moins importante que celle observée chez les patients résidant en zone de transmission élevée et continue.

Dans notre étude, nous avons observé une diminution du nombre de clones à l'âge de 10 ans chez les enfants porteurs asymptomatiques. Cette dépendance vis-à-vis de l'âge a déjà

été mise en évidence au Sénégal (13) et en Tanzanie (19) où la multiplicité des infections était maximale en dessous de 15 ans au Sénégal (13) et entre 2 et 7 ans en Tanzanie (19). L'impact de l'âge sur la multiplicité des infections est variable suivant le niveau de transmission et d'endémicité du site (13, 17, 19). Deux études en Tanzanie ayant porté sur des enfants de moins d'un an ont montré qu'il n'y avait aucune influence de l'âge sur la complexité des infections, mais qu'une corrélation existait entre le nombre de clones de *P. falciparum* et la densité parasitaire (19).

Des études (11, 15) ont montré que l'utilisation de marqueurs génétiques en plus de MSP-2, comme la protéine de surface 1 (MSP-1) ou GLURP (Glutamic acid rich protein), n'apportait pas de résultat plus significatif pour analyser la complexité parasitaire. Aussi avons-nous considéré que le marqueur MSP-2 représentait le meilleur marqueur utilisable pour conduire l'analyse de nos prélèvements à Dienga.

Il apparaît très clairement maintenant qu'une connaissance plus fine de la génétique des populations parasitaires, en particulier la complexité des infections plasmodiales, constitue une donnée épidémiologique qui devrait permettre de mieux mesurer l'impact des moyens thérapeutiques ou de contrôle sur des populations parasitaires infectant l'homme ou le vecteur sur un site donné.

Remerciements

Nous sommes reconnaissants aux enfants et à leurs parents résidant dans le village de Dienga (Gabon) pour leur coopération. Nous remercions spécialement F. LEKOULOU, P. TSHIPAMBA, H. TIGA et J. MAYOMBO pour leur assistance technique dans le dispensaire du village. Nous remercions aussi le Dr Christophe ROGIER pour les analyses statistiques des données présentées dans ce travail. Le Centre international de recherches médicales de Franceville est financé par le gouvernement du Gabon, Elf Gabon et le ministère de la coopération française.

Références bibliographiques

1. 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, **91**, 602-605.
2. BABIKER HA, LINES J, HILL WG & WALLIKER D - Population structure of *Plasmodium falciparum* in villages with different malaria endemicity in East Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **56**, 141-147.
3. BABIKER HA, SATTI G & WALLIKER D - Genetic changes in the population of *Plasmodium falciparum* in a sudanese village over a three-year period. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **53**, 7-15.
4. BECK HP, FELGER I, HUBER W, STEIGER S, SMITH T *et al.* - Analysis of multiple *Plasmodium falciparum* infections in Tanzanian children during the phase III trial of the malaria vaccine Spf66. *J Infect Dis*, 1997, **175**, 921-926.
5. CONTAMIN H, FANDEUR T, ROGIER C, BONNEFOY S, KONATE L *et al.* - Different genetic characteristics of *Plasmodium falciparum* isolates collected during successive clinical malaria episodes in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **54**, 632-643.
6. CONWAY DJ & McBRIDE JS - Population genetics of *Plasmodium falciparum* within a malaria hyperendemic area. *Parasitology*, 1991, **103**, 7-16.
7. CREASEY A, FENTON B, WALKER A, THAITHONG S, OLIVEIRA S *et al.* - Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. *Am J Trop Med Hyg*, 1990, **42**, 403-413.
8. DAUBERSIES P, SALLENAVE-SALES S, MAGNE S, TRAPE JF, CONTAMIN H *et al.* - Rapid turnover of *Plasmodium falciparum* populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, **54**, 18-26.

9. ENGELBRECHT F, FELGER I, GENTON B, ALPERS M & BECK HP - *Plasmodium falciparum*: Malaria morbidity is associated with specific merozoite surface antigen 2 genotypes. *Exp Parasitol*, 1995, **81**, 90-96.
10. FARNERT A, SNOUNOU G, ROTH I & BJORKMAN A - Daily dynamics of *Plasmodium falciparum* subpopulations in asymptomatic children in a holoendemic area. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **56**, 538-547.
11. FELGER I, IRION A, STEIGER S & BECK HP- Epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. Genotypes of merozoite surface protein 2 of *Plasmodium* in Tanzania. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, **93**, suppl 1, S1/3 - S1/9.
12. MERCEREAU-PUIJALON O - Revisiting host/parasite interactions: molecular analysis of parasites collected during longitudinal and cross-sectional surveys in humans. *Parasite Immunol*, 1996, **18**, 173-180.
13. NTOUMI F, CONTAMIN H, ROGIER C, BONNEFOY S, TRAPE JF & MERCEREAU-PUIJALON O - Age-dependent carriage of multiple *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen-2 alleles in asymptomatic malaria infections. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, **52**, 81-88.
14. NTOUMI F, MERCEREAU-PUIJALON O, OSSARI S, LUTY A, RELTIEN J *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.
15. 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.
16. ROBERT F, NTOUMI F, SARTHOU J-L, ROGIER C, FANDEUR T *et al.*- Extensive genetic diversity of *Plasmodium falciparum* isolates collected from patients with severe malaria in Dakar, Sénégal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 704-711.
17. ROPER C, RICHARDSON W, ELHASSAN IM *et al.*- Seasonal changes in the *Plasmodium falciparum* population in individuals and their relationship to clinical malaria: a longitudinal study in a Sudanese village. *Parasitology*, 1998, **116**, 501-510.
18. SAKER EG & SOLOMONS ET- A discussion of the utility of tetrabromophenothalain methyl ester (TBPME) spot test for the identification of drug-positive urines. *J Analyt Toxicol*, 1987, **11**, 86.
19. SMITH T, BECK HP, KITUA A, MWANKUSYE S, FELGER I *et al.*- The epidemiology of multiple *Plasmodium falciparum* infections. 4. Age dependence of multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc trop Med Hyg*, 1999, **93**, Suppl 1, S1/15-S1/20.
20. SNOUNOU G, ZHU X, SIRIPOON N, JARRA W, THAITHONG S *et al.*- Biased distribution of MSP1 and MSP2 allelic variants in *Plasmodium falciparum* populations in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1999, **93**, 369-374.
21. VAILLANT M, MILLET P, LUTY A, TSHIMPABA P, LEKOULOU F *et al.*- Therapeutic efficacy of clindamycin in combination with quinine for treatment uncomplicated malaria in a village dispensary in Gabon. *Trop Med Int Health*, 1997, **2**, 917-919.
22. WALLIKER D, QUAKYI IA, WELLEMS TE, MCCUTCHAN TF, SZARFMAN A *et al.*- Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 1987, **236**, 1661- 1666.