

Épidémiologie du paludisme dans un village de savane soudanienne du Mali (Bancoumana).

1. Réponse immunitaire humorale anti-TRAP et anti-CS.

A. Dolo (1)*, B. Poudiougou (1), D. Modiano (2), F. Camara (1), B. Kouriba (1), M. Diallo, A. Bosman (2), A. Crisanti (2), K. Robson (3) & O. Doumbo (1)

(1) Département d'épidémiologie des affections parasitaires, Faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie, BP 1805, Bamako, Mali. Fax : (00223) 2 22 81 09.

* Email: adolo@mrtcbko.org ou mgndolo@yahoo.fr.

(2) Ist. Parasitologia, WHOCC for malaria epidemiology, Università 'La Sapienza', 00185 Roma, Italie.

(3) MRC Molecular Haematology Unit, Institute of Molecular Medicine, Headington, Oxford, Royaume-Uni.

Manuscrit n°2320. "Parasitologie". Reçu le 24 avril 2001. Accepté le 5 juin 2003.

**Summary: Epidemiology of malaria in a village of Sudanese savannah area in Mali.
1. Anti-TRAP and anti-CS humoral response.**

Vaccine development research is an important component of malaria control strategies. Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) and the circumsporozoite (CS) protein are two antigens of sporozoite surface. Immune response to these two antigens may contribute to the development of anti-sporozoite vaccine. Recent studies suggest that antibodies anti-TRAP may partially block sporozoites penetration in hepatocyte, and thereby reducing malaria morbidity.

We carried out a study to assess the seroprevalence of anti-TRAP and anti-CS antibodies and to identify a possible role of these antibodies on malaria morbidity in children 1-9 years old living in a rural hyperendemic village. We performed 5 cross sectional surveys and a longitudinal follow up in 1993 and 1994. During each cross sectional study, children were examined for fever and splenomegaly; all febrile children received thick film examination, and serologic analysis was performed in one third of these, randomly selected. The results show that the seroprevalence of anti-TRAP and anti-CS varied with age and season ($p < 0,05$). Association between the prevalence of anti-TRAP and splenomegaly was observed during two cross sectional surveys (June and October 1993). The presence of anti-TRAP antibody was associated with Plasmodium falciparum infection at the beginning of the transmission season (June 1993 and July 1994). A negative association between the level of anti-TRAP titre and parasitemia was observed (March and October 1994).

These findings suggest no clear evidence of the protective role of anti-TRAP antibodies in uncomplicated malaria, possibly due to the limited persistence of these antibodies under natural situations.

Résumé :

La recherche vaccinale constitue une voie d'avenir pour le contrôle du paludisme. Les protéines thrombospondin related anonymous protein (TRAP) et circumsporozoite (CS) sont deux antigènes de la surface du sporozoite. La réponse humorale contre ces 2 antigènes pourrait contribuer au développement d'une immunité anti-sporozoite chez les individus des populations vivant en zone d'endémie palustre. Les travaux récents suggèrent que les anticorps anti-TRAP pourraient bloquer en partie la pénétration des sporozoites dans l'hépatocyte et réduire en conséquence la morbidité palustre.

Nous avons mené une étude dans le but de déterminer la séroprévalence anti-TRAP et anti-CS et rechercher le rôle de ces anticorps dans la protection contre la morbidité palustre chez les enfants de 1 à 9 ans vivant dans un village rural d'endémie palustre. L'étude a comporté cinq enquêtes transversales et deux enquêtes longitudinales cliniques en 1993 et 1994. Au cours des enquêtes transversales, une prise de température, une palpation de la rate et une prise de sang (confection de goutte épaisse + sérum pour l'immunologie) ont été effectuées. Nous avons observé que les séroprévalences anti-TRAP et anti-CS varient selon l'âge et les passages ($p < 0,05$). Une association positive entre la présence des anticorps anti-TRAP et la splénomégalie a été observée au cours de deux passages transversaux (en juin et octobre 1993). Nous avons trouvé une association positive entre séroprévalence anti-TRAP et splénomégalie d'une part, entre séroprévalence anti-TRAP et l'infection par Plasmodium falciparum d'autre part en début de saison de transmission (juin 1993 et juillet 1994). Une association négative entre les titres des anticorps anti-TRAP et la parasitémie a été observée au cours de deux passages transversaux (mars et octobre 1994). En conclusion, la présente étude ne met pas clairement en évidence le rôle protecteur des anticorps anti-TRAP vis-à-vis de l'infection due à P. falciparum, de la densité parasitaire ou de la survenue d'accès de paludisme.

malaria
immune response
epidemiology
anti-TRAP
anti-CS
seasonal variation
morbidity
Bancoumana
Mali
Sub-Saharan Africa

paludisme
réponse immunitaire
épidémiologie
anti-TRAP
anti-CS
variation saisonnière
morbidité
Bancoumana
Mali
Afrique intertropicale

Introduction

Les stratégies de contrôle du paludisme sont actuellement basées essentiellement sur l'utilisation des supports imprégnés d'insecticides et le développement de vaccins. De nombreux candidats vaccinaux ont été synthétisés et sont en cours d'évaluation. Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés à la CS ("circumsporozoite protein") et à la TRAP ("Thrombospondin Related Adhesive Protein"), protéine adhésive découverte en 1988 (18). Tandis que la CS a été l'objet de plusieurs travaux de terrain (3, 7, 11, 13, 14), la TRAP reste très peu étudiée.

Les premiers travaux expérimentaux estimaient la localisation de la TRAP sur les formes érythrocytaires du *Plasmodium* (4, 18) et suggéraient son implication sur la cytoadhérence des globules rouges parasités dans les capillaires cérébraux dans le paludisme grave. Actuellement, son expression sur les globules rouges est controversée (20), mais son expression sur les formes pré-érythrocytaires est certaine et a été beaucoup étudiée (4, 17, 18, 19, 20, 24, 25). L'immunité induite contre la TRAP et la PySP2 (homologue de la TRAP de *P. yoelii*) exerce une activité antiparasitaire contre les sporozoïtes et les formes hépatiques du parasite (21). L'inoculation de sporozoïtes irradiés entraîne une forte immunité protectrice anti-sporozoïte chez la souris. L'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *P. falciparum in vitro* est spécifiquement inhibée par les anticorps contre la protéine recombinante de la TRAP (17). Tous ces travaux suggèrent que les anticorps anti-TRAP pourraient bloquer en partie la pénétration des sporozoïtes dans l'hépatocyte, et donc prévenir/réduire la morbidité palustre.

Il est démontré qu'une diminution de la quantité de sporozoïtes injectés entraîne une réduction du nombre de parasites pendant la phase érythrocytaire, aboutissant à une réduction des cas cliniques (15, 21). Ainsi, une étude cas-témoins effectuée en milieu hospitalier au Mali (8, 10, 16) a mis en évidence une association négative entre la séroprévalence anti-TRAP et la gravité du paludisme chez les enfants de 1 à 12 ans ($p = 0,02$); la présence des anticorps anti-TRAP avait aussi une valeur pronostique sur l'évolution de la maladie (10). Nous avons jugé nécessaire de tester ces résultats dans d'autres situations épidémiologiques. C'est ainsi que l'étude en milieu rural a été proposée, car le problème du paludisme (morbidité et mortalité) est de loin plus important dans les populations rurales. La compréhension de la réponse immunitaire naturelle contre la TRAP chez les individus des populations vivant en zone d'endémie paludique pourrait contribuer au développement d'un vaccin. Les objectifs de notre travail sont de décrire la dynamique de la prévalence et des taux d'anticorps anti-TRAP et anti-CS, et d'évaluer leurs associations aux infections par *P. falciparum* ou à la morbidité palustre chez les enfants de 1 à 9 ans résidant dans le village de Bancoumana.

Matériel et méthodes

Le lieu d'étude, la population, le type et les périodes d'étude sont décrits ailleurs (9). Nous détaillerons ici les techniques de biologie moléculaire, d'immunologie et l'analyse des données.

Synthèse du fragment de TRAP utilisé (23)

La séquence codante de la TRAP1.0 (acides aminés 26-498) a été amplifiée à partir de l'ADN génomique de *P. falciparum* (isolat ITO4) par la méthode de PCR standard en 100 µl (22) consistant en 30 cycles de 95 °C (1 mn), 65 °C (30 s), 72 °C (2 mn) dans un thermocycleur. Les amorces utilisées

étaient trap1 (5'-AGTTGGATCCAGAGATGTGAAAA-CAATATAGTGG-3') et trap2 (5'-GCGAGTAAAGC-TAAGCTTCCAGCTATTCCACCTGC-3') et les enzymes de restriction utilisées étaient BamHI et HindIII. Le fragment obtenu a été cloné dans un vecteur approprié d'expression (pDS 56/RBSII, 6xHis/E-) (12) au niveau du polylinker BamHI – HindIII. Ce vecteur possède 6 molécules d'histidine ayant une affinité pour le nickel; le vecteur a été introduit dans *E. coli* souche M15 ayant un lac répresseur produisant le plasmide pUHA1 et mis en culture. La protéine recombinante obtenue a été purifiée par chromatographie d'affinité au nickel.

Dosages des anticorps anti-TRAP, anti-CS

Ils ont été effectués par la technique ELISA à l'Institut de parasitologie de l'université de Rome. Nous avons préalablement mis au point les différents protocoles de dosage en agissant sur certains facteurs (dilutions, temps d'incubation, pH), avant de procéder au traitement de nos échantillons. Pour le dosage des anticorps anti-CS, nous avons utilisé les kits du laboratoire Sclavo (Div. Diagnostici e Strumenti, Siena, Italie) qui utilisent comme antigène l'épitope immunodominant de la CS, constitué par la répétition de quatre acides aminés en tandem 40 fois (Asn-Ala-Asn-Pro), (NANP)40.

Tableau I.

Seuils de séropositivité vis-à-vis des différents antigènes (TRAP et CS).
Seropositivity levels towards different antigens (TRAP and CS).

antigènes	absorbances				
	minimales	maximales	moyennes	écart-types	seuils
TRAP1.0	0,014	0,161	0,07	0,04	0,19
CS	0,006	0,046	0,02	0,01	0,05

Les seuils de séropositivité aux différents antigènes ont été déterminés à partir de la moyenne d'absorbance d'une vingtaine de sérums italiens négatifs plus 3 écart-types (tableau I).

Analyse des données

Le logiciel Epi-info (6) a été utilisé pour la saisie et l'analyse des données. Pour l'évaluation du rôle protecteur des anticorps anti-TRAP et anti-CS, nous avons évalué l'association entre la présence des anticorps anti-TRAP et/ou anti-CS et l'infection par *P. falciparum*, l'association entre la présence des anticorps anti-TRAP et/ou anti-CS et la densité parasitaire (< 5 000 parasites/mm³ de sang et 5 000 parasites/mm³ de sang) au cours des passages transversaux, l'association entre la présence (et le niveau) des anticorps anti-TRAP et/ou anti-CS et la fréquence des accès fébriles palustres au cours des enquêtes transversales, l'association entre la présence (et le niveau) des anticorps anti-TRAP et/ou anti-CS et la fréquence de 2 classes de densité parasitaire (< 100 000 parasites/mm³ de sang et 100 000 parasites/mm³ de sang). Le seuil de 100 000 parasites a été choisi car des études ont montré que les charges parasitaires > 100 000 parasites/mm³ de sang sont associées à la gravité du paludisme.

Résultats

Variations saisonnières des séroprévalences anti-TRAP et anti-CS

Études transversales

Au cours des 5 enquêtes transversales, 961 dosages d'anticorps anti-TRAP et anti-CS ont été faits. Nous avons constaté une augmentation significative de la séroprévalence anti-TRAP et

anti-CS entre le début et la fin de la saison de transmission en 1993 et en 1994 ($p < 0,001$). Les séroprévalences anti-TRAP et anti-CS des débuts de saison de transmission ne présentaient pas de différence d'une année à l'autre ($p = ns$ entre juin 1993 et juillet 1994). Alors que les séroprévalences anti-CS de fin de saison de transmission étaient similaires entre 1993 et 1994 ($p = ns$), celles des anticorps anti-TRAP d'octobre 1994 étaient plus élevées par rapport à celle de 1993 ($p = 0,009$) (tableau II).

Études longitudinales

L'étude longitudinale a permis de collecter 285 sérums entre juillet et octobre 1994 chez les enfants inclus dans le proto-

Tableau II.

Variations des séroprévalences anti-TRAP et anti-CS des enfants de 1-9 ans selon la période.
Variations of anti-TRAP and anti-CS seroprevalences in children aged of 1 to 9 years according to period.

passages	séroprévalence anti-TRAP			séroprévalence anti-CS		
	+	N	%	+	N	%
juin 1993	63	243	25,9	107	205	52,2
oct. 1993	115	248	46,4	191	247	77,4
mars 1994	41	133	30,8	69	134	51,5
juil. 1994	64	193	33,2	111	189	58,7
oct. 1994	87	144	60,4	103	127	81,1
p	< 0,001			< 0,001		

cole de la surveillance clinique. La séroprévalence anti-TRAP des enfants de 1 à 9 ans a augmenté progressivement à partir du mois de juillet (6,7%) et a atteint un maximum en octobre (48%), fin de saison de transmission ($p < 0,001$) (tableau II).

Réponses immunitaires anti-TRAP et anti-CS et infection par *P. falciparum*

Nous avons détecté une association positive entre la présence des anticorps anti-TRAP et la présence du *P. falciparum* chez les enfants de 1 à 9 ans en début de saison de transmission,

Tableau III.

Comparaison des réactivités contre la TRAP des enfants parasités et non parasités au cours des différents passages.
Comparison of reactivities against TRAP among parasitized and non parasitized children during different observations.

goutte épaisse	séroprévalences anti-TRAP												
	juin 1993		octobre 1993		mars 1994		juillet 1994		octobre 1994				
	obs	%	obs	%	obs	%	obs	%	obs	%	obs	%	
positive	106	35	187	84	77	26	120	50	120	41,7	93	60	64,5
négative	131	27	50	26	42	10	66	12	66	18,2	44	23	52,3
	0,03		ns		ns		0,001		ns				
	obs = taille de l'échantillon												

juin 1993, et en juillet 1994. Aux autres passages, bien que les relations n'étaient pas significatives ($p = ns$) (tableau III), une certaine tendance d'association était observée. La relation réponse immunitaire anti-CS et la présence du *Plasmodium* n'étaient pas significatives pour les 2 groupes d'âge au cours des différentes études transversales.

Réponses immunitaires anti-TRAP et anti-CS et densité parasitaire

Nous avons observé une association négative entre la présence des anticorps anti-TRAP et la densité parasitaire en période sèche (mars 1994) et en fin de saison de transmission (octobre 1994); les enfants présentant de fortes parasitemies ($> 5\,000$ parasites/mm³) avaient un bas niveau d'anticorps ($p = 0,03$ en mars et $p = 0,04$ en octobre 1994). Par contre, les taux d'anticorps anti-CS étaient similaires pour les 2 classes de densités parasitaires au cours des 5 enquêtes transversales ($p = ns$).

Réponse immunitaire anti-TRAP et anti-CS et morbidité palustre

Nous n'avons pas observé de relation significative entre la présence des anticorps anti-TRAP et la fréquence des accès fébriles palustres au cours des 5 enquêtes transversales.

Nous avons formé 2 groupes d'enfants selon leurs charges parasitaires ($< 100\,000$ et $100\,000$) et évalué leurs séroprévalences. Nous avons observé une séroprévalence anti-TRAP de 11,1% (5/45) dans le groupe des enfants avec de fortes parasitemies ($> 100\,000$) et de 31,7% (76/240) dans le groupe des parasitemies $< 100\,000$ ($p = 0,005$). Il n'y avait pas d'association significative entre la présence des anticorps anti-CS et la morbidité palustre ($p > 0,05$).

Nous avons observé 2 fois sur 5 passages une association positive entre les anticorps anti-TRAP et anti-CS en octobre 1993 ($p = 0,03$) et en juillet 1994 ($p = 0,002$). Cette association était également significative au cours de la surveillance clinique ($p = 0,002$). Nous n'avons pas trouvé d'association entre la combinaison des anticorps anti-TRAP et anti-CS et la morbidité palustre.

Discussion

Pour l'évaluation de la réponse immunitaire humorale anti-TRAP, une technique ELISA de dosage des anticorps anti-TRAP utilisant la protéine recombinante a été mise au point par l'Institut de parasitologie de l'université de Rome "La Sapienza". Cette technique, peu coûteuse, spécifique, sensible, reproductible, sans danger et faisable dans de petits laboratoires des pays en voie de développement permet de mener des études séroépidémiologiques des populations impaludées. Les informations récoltées au terme de ces travaux pourraient contribuer à préparer le terrain pour un éventuel essai vaccinal à base de TRAP.

La variation saisonnière et l'augmentation selon l'âge des séroprévalences anti-TRAP observée au cours de nos travaux avait déjà été notée dans une autre localité de savane soudanienne au Mali (23). La variation saisonnière et l'augmentation de la séroprévalence (et du niveau) des anticorps anti-CS selon l'âge ont été observées en Tanzanie (7), en Gambie (14), au Burkina Faso (11) au Kenya (3).

Les associations observées entre séroprévalences anti-TRAP et splénomégalie concordent avec les travaux de CRANE *et al.* (5) qui ont observé une augmentation significative de synthèse des IgM et des IgG chez les patients porteurs de splénomégalie.

L'absence d'association entre la présence des anticorps anti-CS et la présence du parasite dans le sang observées dans notre étude confirment les résultats de la Tanzanie (7), du Burkina Faso (11), de la Guinée (2) et du Bénin (1). Par contre, en zone holoendémique au Liberia, une association positive entre la présence des anticorps anti-(NANP)6 et l'infection par *P. falciparum* a été mise en évidence (13).

Nous avons observé 2 fois, en mars et octobre 1994, une association négative entre les titres des anticorps anti-TRAP et la parasitemie. SCARSELLI *et al.* (23) ont également trouvé que la présence des anticorps anti-TRAP en début de saison de transmission corrélait avec le contrôle de la densité parasitaire chez les enfants de 6 à 14 ans. Les mêmes auteurs ont trouvé que les anticorps anti-TRAP ont une longue durée de vie chez l'adulte et une courte durée de vie chez les petits enfants. Nous avons également testé le pouvoir protecteur de la combinaison des anticorps anti-TRAP et anti-CS par les diffé-

rentes approches précitées. Cette étude ne révèle aucun pouvoir protecteur de la combinaison des anticorps anti-TRAP et anti-CS.

Nous n'avons pas trouvé régulièrement une association entre les anticorps anti-TRAP, d'une part avec l'infection par *P. falciparum*, d'autre part avec la densité parasitaire et la morbidité palustre ; par conséquent, la présente étude ne met pas clairement en évidence le rôle protecteur des anticorps anti-TRAP par rapport à l'infection par *P. falciparum*, à la densité parasitaire ou à la survenue d'accès palustre. Ceci pourrait être dû au caractère transitoire et éphémère de la réponse immunitaire dans la tranche d'âge étudiée (23). Nous recommandons la poursuite de la recherche sur un échantillon incluant des adultes, chez lesquels la réponse humorale est plus stable.

Remerciements

Ce travail a bénéficié d'une bourse de formation TDR (A. DOLO). Nous remercions la population du village de Bancoumana pour son esprit de collaboration. Nous sommes très reconnaissants au Prof. M. COLUZZI pour ses encouragements et précieux conseils pendant la rédaction de ce papier. Ce travail a bénéficié de l'appui financier de la communauté européenne, de l'OMS (CTD, réf. M2/181/200 et du RSG/TDR/OMS n° 919396) et du Centre collaborateur de recherche et de formation sur l'épidémiologie du paludisme de l'Institut de parasitologie de l'université de Rome "La Sapienza" (WHO/CC).

Références bibliographiques

- AKOGBETO M, MODIANO D & BOSMAN A - Malaria transmission in the lagoon area of Cotonou, Benin. *Parassitologia*, 1992, **34**, 147-154.
- BOSMAN A, MODIANO D, VOGLINO MC, PIZZI L, BARTOLONI P *et al.* - Malaria transmission in a central area of Futa Djallon (Guinea): results of a parasitological survey during the 1989 rainy season. *Parassitologia*, 1992, **34**, 135-142.
- CAMPBELL GH, COLLINS FH, BRANDLING-BENNET AD, SCHWARTZ IK & ROBERTS JM - Age-specific prevalence of antibody to a synthetic peptide of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in children from three villages in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 1987, **37**, 220-224.
- COWAN G, KRISHNA S, CRISANTI A & ROBSON KJR - Expression of the thrombospondin related anonymous protein in *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Lancet*, 1992, **339**, 1412-1413.
- CRANE GG, GARDNER A, HUDSON P, HUDSON B & VOLLER A - Malaria antibodies in tropical splenomegaly syndrome in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1977, **71**, 308-314.
- DEAN AD, DEAN JA, BURTON AH & DICKER RC - Epi Info, Version 5: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on micro-computers. USD Inc, Stone Mountain, Georgia, USA, 1990.
- DEL GIUDICE G, ENGBERS HD, TOUGNE C, BIRO SS, WEISS N *et al.* - Antibodies to the repetitive epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in a rural Tanzanian community: a longitudinal study of 132 children. *Am J Trop Med Hyg*, 1987, **36**, 203-212.
- DOLO A - Réponse immunitaire anti-TRAP (Thrombospondin related adhesive protein) et morbidité palustre dans une zone d'hyperendémie palustre du Mali (Afrique de l'Ouest). Thèse PhD, Université de Rome "La Sapienza", Rome, 1997.
- DOLO A, CAMARA F, POUADIOUGO B, TOURÉ A, DIALLO M *et al.* - Epidémiologie du paludisme dans un village de savane soudanienne du Mali (Bancoumana). 2. Etude entomo-parasitologique et clinique. *Bull Soc Pathol Exot*, 2003, **96**, 308-312.
- DOLO A, MODIANO D, BOSMAN A, SACCHIO S, DOUMBO O *et al.* - TRAP a potential malaria vaccine candidate. *Parassitologia*, 1999, **41**, 425-428.
- ESPOSITO F, LOMBARDI S, MODIANO D, ZAVALA F, REEME J *et al.* - Prevalence and levels of antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* in an endemic area and their relationship to resistance against malaria infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1988, **82**, 827-832.
- Hochuli E, Gillessen D & Kocher HP - New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidines residues. *J Chromatogr*, 1987, **411**, 177-184.
- HOGH B, MARBIAH NT, PETERSON H, PERLMANN H, DOLOPAYE E *et al.* - A longitudinal study of seroactivities to *Plasmodium falciparum* antigens in infants and children in a holoendemic area of Liberia. *Am J Trop Med Hyg*, 1991, **44**, 191-200.
- MARSH K, HAYES RJ, CARSON DC, OTOO L, SHENTON F *et al.* - Anti-sporozoites antibodies and immunity to malaria in a rural Gambian population. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1988, **82**, 532-537.
- MODIANO D, DOLO A, BOSMAN A, DOUMBO O, KEITA MM *et al.* - Humoral immunity against thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum* is associated, in children under the age of four, with protection against severe malaria. *Parassitologia*, 1994, **36**, Suppl. 1, p 94.
- MOLINEUX L & GRAMICCIA G - *The Garki Project. Research on epidemiology and control of malaria in the Sudan Savannah of West Africa*. 1980, OMS Genève.
- MÜLLER HM, RECKMAN I, HOLLINGDALE MR, BUJARD H, ROBSON K & CRISANTI A - Thrombospondin related anonymous protein of *Plasmodium falciparum* binds specifically to the sulphated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma Cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *EMBO J*, 1993, **12**, 2881-2889.
- ROBSON KJR, FREVERT U, RECKMAN I, COWAN G, BEIER J *et al.* - Thrombospondin related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *EMBO J*, 1995, **14**, 3883-3894.
- ROBSON KJR, HALL JRS, JENNINGS MW, HARRIS TJR, MARSH K *et al.* - A highly conserved amino acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stage of human malaria parasite. *Nature*, 1988, **335**, 79-82.
- ROGERS WO, MALIK A, MELLOUK S, NAKAMURA K, ROGERS MD *et al.* - Characterisation of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**, 9176-9180.
- ROGERS WO, ROGERS MD, HEDSTROM RC & HOFFMAN S - Characterization of the gene encoding sporozoite surface protein 2, a protective *Plasmodium yoelii* sporozoite antigen. *Mol Biochem Parasitol*, 1992, **53**, 45-52.
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R *et al.* - Primer-directed amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, **239**, 487-491.
- SCARSELLI E, TOLLE R, KOITA O, DIALLO M, MULLE HM *et al.* - Analysis of the human antibody responses to thrombospondin related anonymous protein of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*, 1993, **61**, 3490-3496.
- SULTAN AA, THATHY V, FREVERT U, ROBSON KJR, CRISANTI A *et al.* - TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of *Plasmodium* sporozoites. *Cell*, 1997, **90**, 511-522.
- WENGELNIK K, SPACCAPELO R, NAITZA S, ROBSON KJR, JANSE CJ *et al.* - The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *EMBO J*, 1999, **18**, 5195-5204.