

Analyse des facteurs génétiques contrôlant l'infection palustre chez l'homme

Yves Traoré, Pascal Rihet, Thérèse Traoré-Leroux, Christophe Aucan, Pierre Gazin, Marc Coosemans, Anouchka Smith, Laurent Abel, François Tall, Boubacar Nacro, Alfred Traoré, Francis Fumoux

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est un problème majeur de santé publique en Afrique au sud du Sahara. Le nombre d'accès palustres est estimé à plus de 300 millions par an et la mortalité annuelle, essentiellement infantile, se situe entre 1,7 et 2,4 millions d'individus [1]. Dans les régions de paludisme stable, à la suite de l'inoculation du parasite, l'évolution de l'infection et l'apparition de la maladie varient selon les individus. En sus des facteurs environnementaux, de nombreux facteurs du parasite et de l'hôte sont susceptibles de contrôler cette évolution. Ainsi, la densité de l'inoculum, des facteurs génétiques du parasite ainsi que des facteurs génétiques de l'hôte

interviennent simultanément. L'existence de différences de virulence entre les souches de *P. falciparum* a été mise en évidence depuis fort longtemps et fait toujours l'objet de nombreux travaux [2]. Le rôle des facteurs génétiques de l'hôte dans le contrôle de l'infection a été clairement montré dans des modèles animaux, en particulier dans les modèles murins [3, 4]. Chez l'homme, de nombreux résultats sont également en faveur d'un contrôle génétique de la susceptibilité/résistance au paludisme [5-6].

Des études de type cas-témoins ont permis d'identifier, au niveau de certains gènes, des variants conférant une résistance ou une susceptibilité accrues aux formes graves de paludisme. Plusieurs gènes ont ainsi été associés aux formes graves. Ce sont essentiellement des gènes impliqués dans la structure ou le métabolisme des globules rouges [7, 8] et des gènes des classes I, II et III appartenant au locus du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [9, 10]. L'importance réelle de ces gènes dans la population humaine est mal connue; en particulier, de telles associations n'ont été retrouvées ni avec les accès palustres simples, ni avec la charge parasitaire sanguine. Les processus conduisant aux phénomènes pathologiques sont insuffisamment compris bien qu'il soit établi qu'une charge parasitaire sanguine importante joue un rôle déterminant dans l'apparition des accès palustres [11, 12]. Une meilleure connaissance du contrôle génétique de la charge parasitaire sanguine est donc primordiale. D'autres études cas-témoins ont montré également le rôle de facteurs génétiques dans le contrôle de la réponse immune à certains antigènes de *P.*

falciparum; ainsi les taux d'anticorps présentent une meilleure concordance chez les jumeaux monozygotes que chez les dizygotes [13, 14].

Une des difficultés majeures des études précédentes, la sélection des témoins, disparaît dans les analyses familiales qui incluent par définition leurs propres témoins. Idéalement, à partir d'une cohorte familiale, ces analyses familiales comprennent une analyse de ségrégation (*encadré*) complétée par une analyse de liaison. Les analyses de ségrégation permettent de déterminer l'existence et le mode de transmission du ou des gènes contrôlant le phénotype. Les différents facteurs corrélés au phénotype étudié doivent être pris en compte. Divers modèles ont été développés, permettant d'inclure l'influence de facteurs environnementaux, individuels et génétiques dans les différentes hypothèses [15]. Les analyses de liaison génétique permettent une analyse systématique du génome et l'identification des gènes, même sans hypothèses préalables sur leur fonction. L'identification des gènes contrôlant des phénotypes en relation avec l'infection palustre devrait ainsi permettre de progresser dans la connaissance des mécanismes de contrôle des niveaux d'infection, des voies impliquées dans la pathogenèse et de mieux comprendre les relations entre les différentes formes cliniques.

Afin de définir l'importance des facteurs génétiques dans le paludisme, nous avons réalisé le suivi, pendant deux saisons de transmission, d'une population de presque 400 habitants résidant dans un quartier périphérique de la ville de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso) où le

Y. Traoré, T. Traoré-Leroux : Centre Muraz, OCCGE, BP153, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

P. Rihet, C. Aucan, F. Fumoux : Faculté des Sciences de Luminy, 163, avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France.
L. Abel : INSERM U. 436, Modèles mathématiques en biologie et en médecine, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47, bd de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 15, France.

P. Gazin : ORSTOM, 213, rue Lafayette, 75480 Paris Cedex 10, France.

M. Coosemans, A. Smith : Institut de médecine tropicale, Nationalestraat 155, Anvers 2000, Belgique.

F. Tall, B. Nacro : Hôpital Souro Sanou, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

A. Traoré : Faculté des sciences et techniques, Université de Ouagadougou, BP7021 Ouagadougou, Burkina Faso.

Tirés à part : F. Fumoux

Tél. : (+33)/4 91 82 90 21

Fax : (+33)/4 91 41 66 69

Mél : fumoux@luminy.univ-mrs.fr

paludisme est endémique. Les phénotypes qui ont été analysés sont la charge parasitaire sanguine, les accès palustres et la réponse immunitaire protectrice ; nous présentons dans cet article les données génétiques complètes concernant le phénotype charge parasitaire sanguine.

Matériel et méthode

Population de l'étude

La ville de Bobo-Dioulasso dans le Sud-Ouest du Burkina Faso est située en zone de savane arborée proche de l'isohyète 1000 mm, avec une saison des pluies de juin à octobre. Cette ville de 400 000 habitants environ en 1995 a une croissance annuelle supérieure à 5 %, entraînant la création rapide de nouveaux quartiers en périphérie. Notre travail a été mené dans un de ces quartiers, Sarfalao, urbanisé depuis 1985 et comptant actuellement près de 20 000 habitants. La zone d'étude d'une surface totale de 5 hectares est formée de trois blocs voisins constitués de maisons individuelles. Toutes les familles volontaires ayant au moins un enfant ont été incluses pour une période de 2 ans. Une analyse exhaustive des relations familiales a été effectuée au début de l'étude à partir des documents officiels et les relations familiales ont été régulièrement vérifiées. Tous les habitants parlent couramment dioula et ont généralement une bonne compréhension du français. Les adultes inclus dans l'étude ont été complètement informés des objectifs du travail et ont donné leur accord. La population a bénéficié d'examen biologiques réguliers et d'un accès gratuit à certains soins. Le protocole de l'étude a été approuvé par le ministère de la Santé du Burkina Faso et par les autorités sanitaires de la ville de Bobo-Dioulasso (Direction provinciale de la santé).

Entomologie

Les données pluviométriques de la station météorologique de l'aéroport de Bobo-Dioulasso n'ont pas montré de différences significatives durant les deux années de l'étude. Les données entomologiques ont été obtenues à partir de captures effectuées sur appât humain de 18 heures à 6 heures. Deux fois par mois pendant deux jours consécutifs, des captures ont été réalisées dans trois domiciles de juin à novembre 1994, puis de

mai à décembre 1995. Ces trois maisons étaient dispersées dans le quartier. Le reste de l'année, correspondant aux périodes de faible transmission, une seule capture mensuelle a été réalisée pendant deux jours consécutifs. La première année, de août à novembre, les captures ont été effectuées à l'intérieur et à l'extérieur des habitations. Le rapport entre le nombre d'anophèles capturés à l'intérieur et à l'extérieur étant de 0,9, les captures ultérieures ont été effectuées exclusivement à l'extérieur, pratique mieux acceptée par la population. La recherche d'antigènes circumsporozoïtaires de *P. falciparum* dans les glandes salivaires a été réalisée par un test ELISA indirect utilisant l'anticorps monoclonal 2A10 [16]. Les prélèvements montrant au moins 25 pg d'antigène par puits ont été considérés comme positifs.

Détermination du phénotype charge parasitaire sanguine

La recherche de plasmodium a été réalisée par prélèvement sanguin à l'extrémité du doigt chez les sujets présents lors des 14 passages effectués d'avril à décembre 1994 et des six passages effectués d'avril à décembre 1995. La numération des parasites sur frottis a été effectuée indépendamment par deux lecteurs pour la totalité des prélèvements. La densité parasitaire (DP) a été établie à partir du frottis par la lecture de 100 champs au grossissement 100, sur la base de 200 hématies par champ et une moyenne de 4 millions d'hématies par mm³ de sang [17]. En cas de discordance de la DP supérieure à 20 %, les frottis étaient examinés par deux autres lecteurs. À partir de la DP, une transformation logarithmique Ln (1 + DP) (LDP) était alors effectuée. Nous avons ainsi établi pour chaque passage la valeur de la charge parasitaire sanguine moyenne (LDP) à partir de la totalité de la population présente lors de ce passage. Afin de prendre en compte l'aspect saisonnier de la transmission, chaque LDP individuelle a été corrigée en lui soustrayant la moyenne des LDP calculée lors de chaque passage. Une nouvelle variable, la moyenne des densités parasitaires (MDP), a été ainsi définie pour chaque individu. Les sujets n'ayant pas eu au moins deux prélèvements, soit 8 % de la population, sont considérés comme étant de phénotype inconnu. Les prélèvements effectués pendant les trois semaines sui-

vant un accès palustre ou réalisés chez un malade n'ont pas été pris en compte. Pour chaque individu, la MDP a ainsi été déterminée pour 1994, 1995 et simultanément pour les deux années.

Les différentes hémoglobines et les groupes sanguins ABO et Rh ont été déterminés sur 281 individus de l'étude âgés de 4 à 80 ans. La détermination des hémoglobines a été réalisée par électrophorèse sur acétate de cellulose et les groupes sanguins ont été déterminés par agglutination en utilisant deux séries d'anticorps commercialisés.

Analyses de ségrégation et de liaison génétique

L'analyse de ségrégation a été effectuée en utilisant le modèle développé par Bonney pour les traits continus [15]. La recherche de liaison génétique avec la charge parasitaire sanguine a été effectuée chez 34 familles nucléaires ayant au minimum trois enfants. Le génotype a ainsi été déterminé chez 212 individus (59 parents et 153 enfants), soit 285 paires de germains (enfants d'une famille nucléaire). L'âge moyen des germains est de 12,1 ± 6,2 ans (1 à 34 ans). Après extraction de l'ADN des cellules sanguines, l'analyse des marqueurs microsatellites a été effectuée selon la technique de Vignal [18]. Plusieurs régions chromosomiques contenant des gènes intervenant dans la réponse immunitaire ont été testées. Pour la région q31-33 du chromosome 5, dix marqueurs très polymorphes ont été utilisés. Les analyses de liaison ont été réalisées à l'aide du programme Mapmaker/sibs, version 2, en utilisant deux méthodes proposées pour les traits quantitatifs : la méthode d'Haseman-Elston [19] et une méthode non paramétrique proposée par Kruglyak [20].

Résultats

Structure de la population

Les 389 participants de l'étude se répartissent en 41 familles, le pourcentage des moins de 15 ans est de 42 %, le nombre moyen d'enfants par famille est 5,7 (extrêmes 1 à 12) et le *sex ratio* 0,93. Ces valeurs sont comparables aux données démographiques de la ville de Bobo-Dioulasso au début des années 90. Les participants à l'étude sont d'ethnies Mossi (50 %), Dafing (19 %), Guian (5 %),

Bissa (15 %), Samogo (1 %), Bobo (6 %), Nounouma (4 %). Mossi et Bissa sont originaires du Centre du Burkina Faso, les autres ethnies de l'Ouest du pays.

Transmission du paludisme

En 1994, 108 séances de capture ont été effectuées et 72 ont été réalisées en 1995. Pour les trois domiciles, le nombre d'anophèles capturés est similaire. Pendant la saison sèche, aucun anophèle n'a été observé. Les vecteurs apparaissent en juillet, leur nombre augmente rapidement à la mi-août, et ils restent nombreux jusqu'à la mi-octobre puis disparaissent au début du mois de novembre. Le nombre de piqûres infestantes par homme et par nuit est de 0,31 en juillet et de 0,93 de la mi-août à la mi-octobre. L'indice sporozoïtique augmente fortement durant les mois de transmission, passant de 1 % en juin à presque 7 % en fin de saison de transmission. *An. arabiensis*, *An. nili* et *An. funestus* n'interviennent pas dans la transmission, seul *An. gambiae s.l.* intervient significativement, assurant de 30 à 35 piqûres infestantes annuelles, regroupées sur 3 mois (figure 1). L'exposition est identique pour toutes les maisons. En absence de méthode de protection, la totalité de la population est soumise à un risque similaire. Les variations annuelles sont faibles, inférieures à 15 % pendant les deux années de l'étude.

Analyse du phénotype charge parasitaire sanguine

La détermination de la charge parasitaire sanguine chez 60 enfants âgés de 8 à 12 ans a été effectuée tous les jours, pendant une période de trois semaines en fin de saison de transmission, dans une école de village de la région où la transmission et les indices malariologiques sont élevés [21]. Une telle fréquence de prélèvements ne pouvant pas être poursuivie sur une longue période, nous avons tenté de déterminer si des prélèvements isolés ou séparés par une, deux ou trois semaines pouvaient être un bon reflet de la moyenne des densités parasitaires quotidiennes. La moyenne de deux prélèvements séparés par un intervalle de deux semaines présente une bonne corrélation ($r = 0,73$, $p < 10^{-4}$) avec la charge parasitaire globale (figure 2). La moyenne de deux prélèvements séparés par une semaine n'améliore

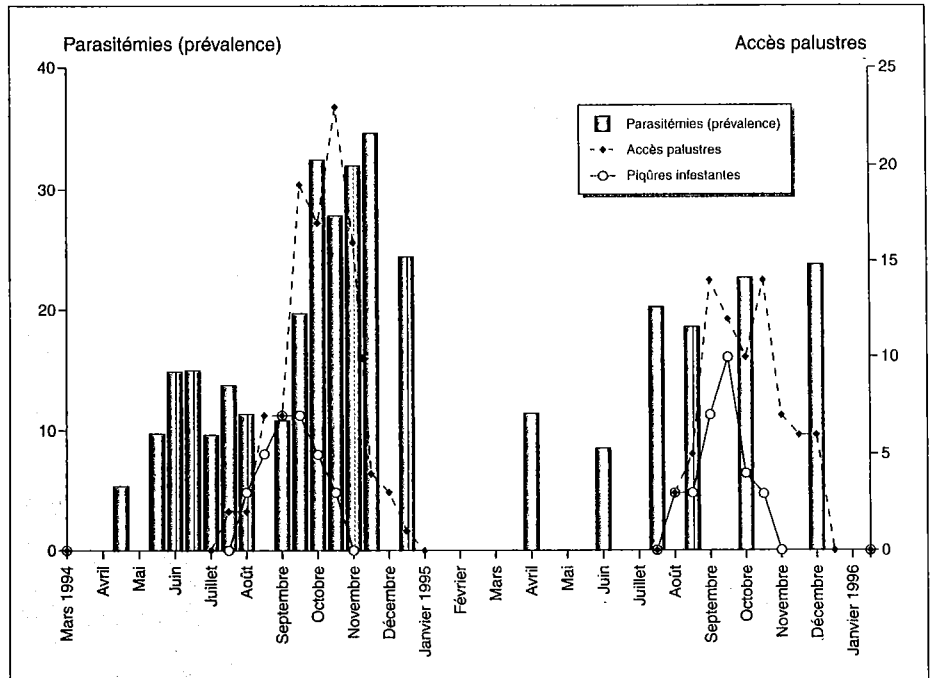


Figure 1. Cinétique de la prévalence parasitaire, du nombre d'accès palustres et du nombre de piqûres infestantes de la population de l'étude (mars 1994 à janvier 1996).

Figure 1. Changes in parasite prevalence, number of bouts of malaria and of infected bites in the study population (March 1994-January 1996).

pas la corrélation. Un intervalle de quinze jours fournit donc une bonne évaluation de la densité parasitaire globale. Cette fréquence des prélèvements a été retenue pour la saison de transmission. Pour la totalité de la population, le taux de compliance a été de 61 % (extrêmes

de 1 à 20). Quarante-vingt-cinq pour 43 à 75 pour chaque passage), sans variations saisonnières significatives. Quatre mille sept cent huit (4 708) observations parasitologiques ont été réalisées, le nombre moyen de prélèvements par individu est de $12,8 \pm 5,1$ (extrêmes de 1 à 20). Quarante-vingt-cinq pour

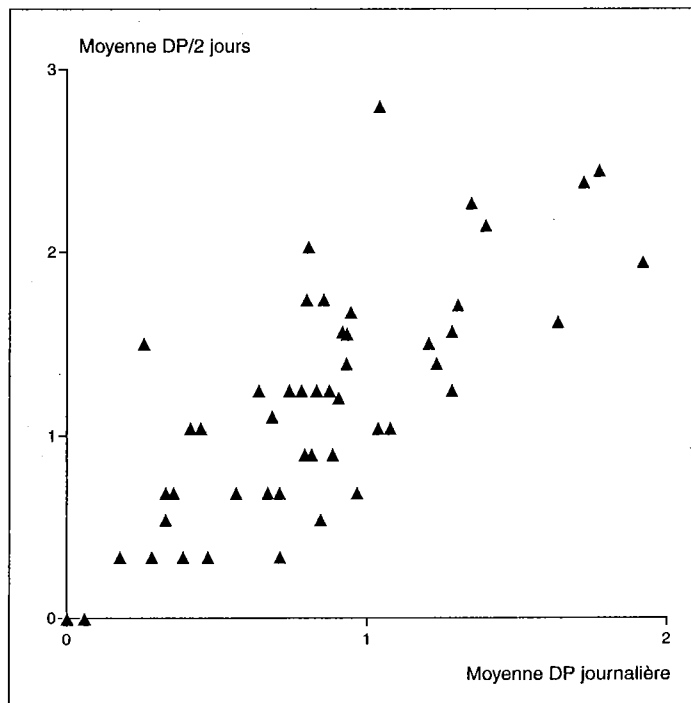


Figure 2. La moyenne des densités parasitaires (DP) de deux prélèvements séparés par un intervalle de 15 jours montre une forte corrélation ($r = 0,73$, $p < 0,0001$) avec la charge parasitaire journalière totale de la même période. Les prélèvements ont été réalisés chez 60 enfants âgés de 8 à 12 ans.

Figure 2. Mean parasite density (DP) for two samples, taken 15 days apart, showing a strong correlation ($r = 0,73$, $p < 0,0001$) with the total daily parasite load over the same period. Samples were taken from 60 children aged between 8 and 12 years.

cent des prélèvements contenaient *P. falciparum*, les autres *P. malariae*. Les formes sexuées n'ont pas été prises en compte pour l'analyse. La proportion d'individus présentant toujours des prélèvements négatifs était inférieure à 30 %, cette proportion étant de 10 % chez les moins de 14 ans. Pour les plus de 20 ans, la prévalence parasitaire était inférieure à 50 % (figure 3). La densité parasitaire était liée à la période de prélèvement ($p < 10^{-4}$) et présentait une forte variabilité individuelle observable surtout jusqu'à l'âge adulte. Pour un même individu, la corrélation de la moyenne des densités parasitaires (MDP) est forte d'une année à l'autre ($r = 0,75$, $p < 10^{-4}$) (figure 4). L'ethnie, le sexe, les groupes sanguins et les différentes hémoglobines n'ont pas eu d'influence sur la MDP, cependant l'âge a une influence importante. Les valeurs de la MDP ne sont pas réparties au hasard dans la population mais regroupées dans certaines familles avec un effet significatif de l'appartenance à une même famille ($p < 10^{-4}$).

L'analyse de ségrégation met en évidence la présence de fortes corrélations familiales notamment entre germains et un effet génétique important sur la distribution du phénotype. Elle est ainsi fortement en faveur de l'existence de facteurs génétiques contrôlant la charge parasitaire sanguine. Toutefois, la modélisation ne permet pas de conclure à l'existence d'un gène unique et suggère un mode de transmission plus complexe, comme par exemple l'existence de plusieurs gènes. L'influence des ces gènes étant plus marquée chez les enfants que chez les adultes, une analyse de liaison génétique a donc été réalisée chez les enfants. Plusieurs régions candidates contenant des gènes impliqués dans la réponse immunitaire ont été testées en utilisant l'ADN de 153 germains provenant de 34 familles (soit au total 285 paires de germains). Nous avons ainsi localisé un gène contrôlant la charge parasitaire : situé sur le bras long du chromosome 5 dans la région q31-33 (figure 5). Dans cette région où nous avons analysé le polymorphisme de 10 marqueurs microsatellites, une liaison entre la charge parasitaire et deux marqueurs microsatellites D5S393 et D5S658, séparés de 1,8 cM, est observée ($p < 0,004$). Cette liaison est retrouvée en utilisant deux méthodes différentes d'analyse (Haseman-Elston et méthode non paramétrique). Les analyses multipoints la confirment ($p = 0,0007$). Un locus que nous avons

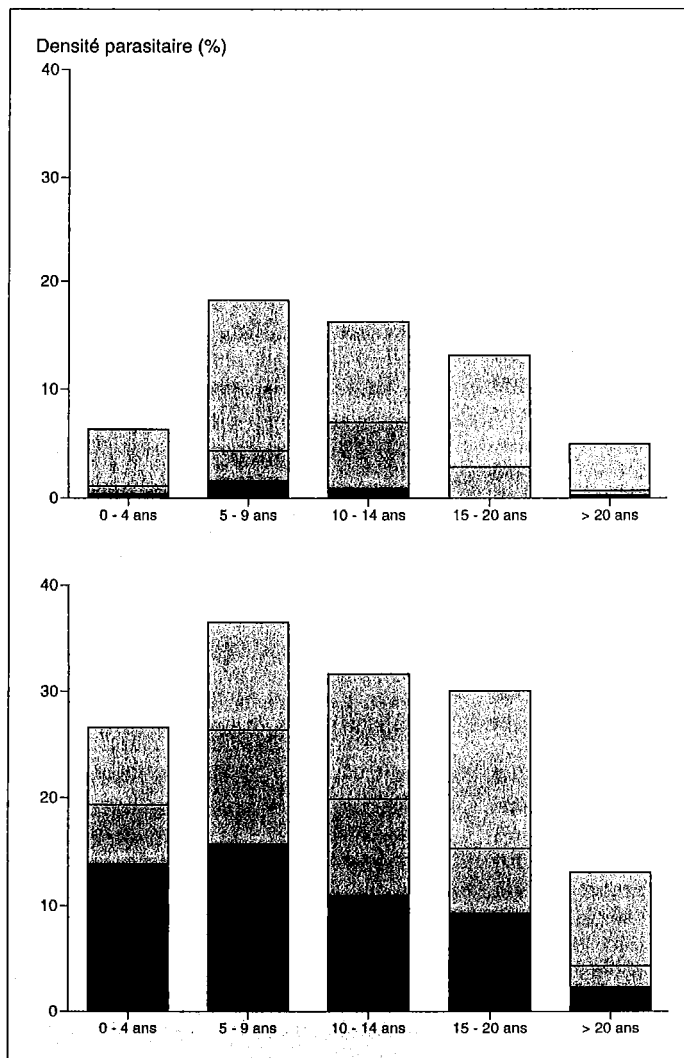


Figure 3. Prévalence et densité de *P. falciparum* par groupe d'âge en 1994 et 1995. A : période de non transmission (2 313 prélèvements effectués). B : période de transmission (2 358 prélèvements effectués). Densité parasitaire : gris : < 1 000/µl, bleu clair : de 1 000 à 4 999/µl, noir : de 5 000 à 9 999/µl, bleu foncé : > 10 000/µl.

Figure 3. Prevalence and density of *P. falciparum* for each age group in 1994 and 1995. A : non-transmission period (2,358 samples taken). B : transmission period (2,358 samples taken). Parasite density: gray: < 1,000/µl, light blue: 1,000-4,999, black: 5,000-9,999/µl, dark blue: > 10,000/µl.

dénomme *Pfil 1* (*Plasmodium falciparum* infection levels 1) contenant un gène impliqué dans le contrôle de la charge parasitaire sanguine a donc été mis en évidence. Les variations de cette région expliquent 45 % de la variance de la charge parasitaire sanguine.

Discussion

Nous avons effectué pendant 2 ans un suivi du phénotype charge parasitaire sanguine, dans une population de presque 400 personnes comprenant 41 familles. Le but principal de ce travail est de mettre en évidence l'existence de gènes contrôlant la charge parasitaire sanguine, ces gènes étant probablement impliqués dans la réponse immunitaire. La recherche d'un facteur génétique ne peut bien évidemment s'effectuer qu'en pre-

nant en compte l'influence des facteurs de l'environnement sur les phénotypes étudiés. Nos observations sur la transmission du paludisme et sur la consommation de médicaments antipalustres nous permettent de considérer cette population comme homogène en termes de transmission et de prophylaxie antipalustre. Des différences inter-ethniques ont été décrites pour la charge parasitaire sanguine et la fréquence des accès palustres dans des populations rurales sympatriques du centre du Burkina Faso. Ces différences de susceptibilité qui ne peuvent être expliquées ni par la mutation HbS, ni par les allèles HLA de classe II suggèrent fortement l'existence d'autres facteurs génétiques [22]. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les groupes ethniques et nous n'avons pas non plus noté d'association de l'hémoglobine S avec la charge parasitaire. Nos données so-

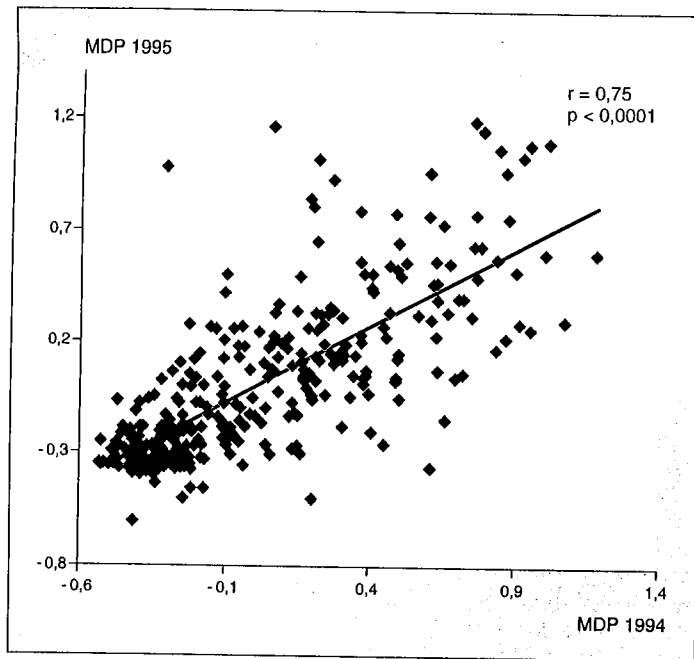


Figure 4. Le phénotype charge parasitaire sanguine est stable pendant les deux années de l'étude. Moyenne des densités parasitaires (MDP) en 1994 et 1995 pour chaque individu.

Figure 4. Blood parasite load phenotype was stable over the two years of the study. Mean parasite density (MDP) in 1994 and 1995 for each individual.

similaires à celles recueillies par d'autres auteurs qui montrent l'absence d'effet de l'hémoglobine S sur la charge parasitaire [23-24]. L'effet protecteur de l'hémoglobine S est cependant amplement démontré dans les formes cliniques graves. Notre analyse de ségrégation a montré au sein de chaque fratrie une forte corréla-

tion entre les germains. L'existence de facteurs génétiques expliquerait une grande partie de la variance de la charge parasitaire. La transmission de cet effet génétique n'est cependant pas compatible avec l'existence d'un gène majeur, ce qui laisse supposer un contrôle polygénique de ce phénotype. L'existence d'un gène majeur

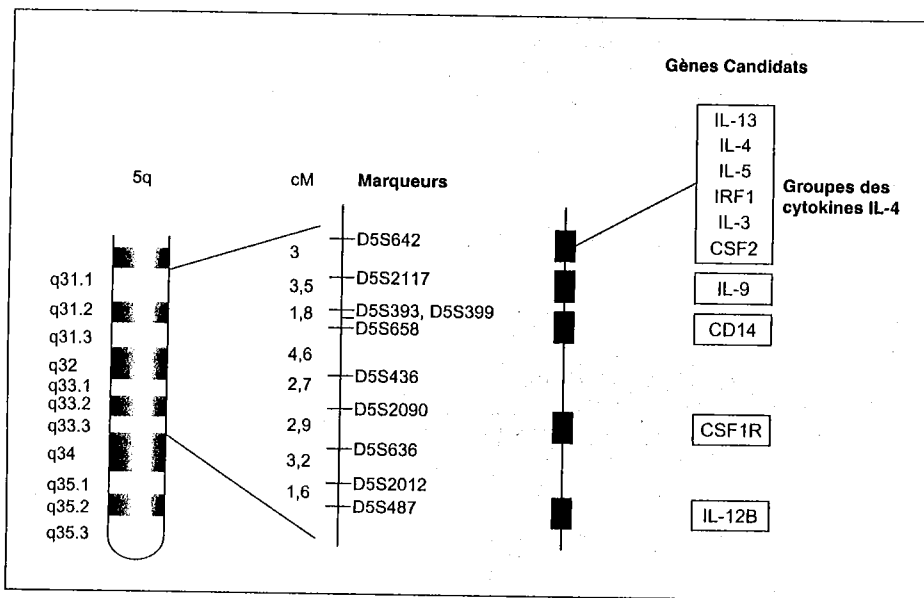


Figure 5. Carte schématique de la région q31-33 du chromosome 5 et localisation des marqueurs microsatellites utilisés pour l'analyse de liaison génétique. Une liaison significative ($p < 0,004$) entre la charge parasitaire et deux marqueurs microsatellites D5S393 et D5S658 séparés de 1,8 cM est observée. Les principaux gènes candidats sont indiqués; IL : interleukine, CSF : facteurs stimulant des colonies, IRF : facteur de régulation de l'interféron.

Figure 5. Schematic map of region q31-33 of chromosome 5, showing the location of microsatellite markers used for the analysis of genetic linkage. A significant genetic link ($p < 0.004$) between the parasite load and the microsatellite markers D5S393 and D5S658, separated by 1.8 cM was observed. The principal candidate genes are indicated: IL: interleukin, CSF: colony-stimulating factors, IRF: interferon regulatory factor.

contrôlant la charge parasitaire palustre a été postulée [25], cependant ces données n'ont pas été confirmées dans d'autres populations par les mêmes auteurs [26], ni dans les deux analyses de ségrégation que nous avons réalisées au Burkina Faso [27, 28]. Globalement, tous ces résultats sont en faveur d'un contrôle polygénique; il n'est cependant pas impossible que plusieurs gènes différents soient impliqués dans la résistance au paludisme dans différentes populations humaines. Il est donc important d'étendre ce type d'étude à d'autres populations.

En zone d'endémie palustre, le développement de la réponse immune protégeant contre les stades sanguins asexués de *P. falciparum* est relativement lent [29]. Des facteurs génétiques influençant la réponse immune contre le parasite sont codés par des gènes situés dans ou à l'extérieur du CMH [13, 14]. La région 5q31-q33 contient plusieurs gènes candidats intervenant dans la régulation de la réponse immune contre les *Plasmodium*. Des gènes régulant la balance des lymphocytes T auxiliaires Th1 and Th2 tels que les gènes de l'interleukine 4 (IL-4) et de l'interleukine 12 (IL-12) y sont localisés [30]. L'on sait par ailleurs que la production d'anticorps contre *P. falciparum* est sous le contrôle de l'IL-4, et que l'injection d'IL-12 recombinante confère une protection stérilisante contre *P. cynomolgi* chez le singe [31]. Dans cette région 5q31-33, ont été localisés également des gènes impliqués dans l'asthme [32], dans les hyperéosinophilies, ainsi que dans le contrôle du taux d'IgE sériques [33] et de l'intensité de l'infection dans la schistosomose [34, 35], ce qui montre l'importance biologique de cette région.

L'identification actuellement en cours des gènes contrôlant l'infection palustre ouvre des voies d'approches nouvelles pour le développement de stratégies préventives et thérapeutiques du paludisme. À moyen terme, il devrait être possible d'identifier les groupes ou les individus à risque vers qui les mesures préventives et les mesures thérapeutiques devraient être dirigées en priorité. Ces nouvelles stratégies pourront passer par le développement de composés actifs pharmacologiques prenant en compte l'effet de ces gènes. Enfin, les connaissances acquises dans le domaine des réponses immunitaires protectrices sont d'un intérêt primordial pour le développement de vaccins et l'identification de molécules capables d'orienter efficacement la réponse immune lors de vaccination ■

Encadré

Analyse de ségrégation

L'analyse de ségrégation est la première étape permettant de déterminer, à partir de données familiales, le mode de transmission d'un phénotype. Le principe général de cette méthode est de déterminer, par des tests statistiques, le mode de transmission expliquant le mieux les distributions familiales observées du phénotype étudié. Des modèles mathématiques ont été développés et incluent l'influence de facteurs environnementaux et génétiques dans les différentes hypothèses concernant le mode de transmission du phénotype. Dans ces modèles, l'expression du phénotype est supposée être sous la dépendance de trois composantes.

1/ Des facteurs de milieu. Lorsque le phénotype étudié est quantitatif, comme pour notre étude sur l'infection à *P. falciparum* où le phénotype est le nombre de parasite par mm³ de sang, la prise en compte des facteurs de milieu se fait par un ajustement des données sur ces facteurs par des méthodes statistiques classiques.

2/ Un gène majeur mendélien di-allélique. La prise en compte de ce gène majeur se fait en considérant que l'échantillon est constitué de trois groupes d'individus, correspondant aux trois génotypes possibles. Dans ce cas, la distribution du phénotype n'est plus homogène, mais composée d'une combinaison de trois distributions. De plus, la répartition dans l'échantillon de ces trois groupes d'individus n'est pas aléatoire, mais doit respecter dans les familles les lois de la transmission mendélienne.

3/ Des facteurs de corrélation familiale non spécifiques, c'est-à-dire sans hypothèse particulière sur leur origine (génétique ou environnementale). Leur principe de calcul est proche d'un calcul de corrélation classique entre deux variables quantitatives ; on peut ainsi déterminer un coefficient de corrélation parent-enfant et enfant-enfant.

Les différentes hypothèses pouvant expliquer les distributions familiales observées (présence de facteurs de milieu, de facteurs de corrélation familiale non spécifiques ou d'un gène majeur) peuvent s'emboîter les unes dans les autres et être testées les unes par rapport aux autres par des méthodes statistiques classiques (rapport de vraisemblance). Schématiquement, l'analyse se décompose de la façon suivante :

- ajustement des données sur les facteurs de milieu influençant significativement le phénotype étudié ;
- sur les données ajustées, on répond alors aux questions suivantes :
 - existe-t-il une ressemblance familiale ? On teste si la présence des facteurs de corrélation familiale non spécifiques améliore significativement l'explication des observations ;
 - si oui, cette ressemblance est-elle, au moins en partie, expliquée par la présence d'un gène majeur ? On ajoute l'effet du gène majeur aux facteurs de corrélation précédents et on teste si cet apport entraîne une amélioration significative ;
 - si oui, les distributions familiales observées sont-elles compatibles avec les lois de la transmission mendélienne ? Différents tests permettent alors de vérifier la compatibilité des distributions observées avec celles attendues d'après les lois de Mendel.

Ce n'est qu'à ce moment que l'on pourra conclure à l'existence (ou non) d'un effet génétique et à la présence (ou non) d'un gène majeur intervenant dans l'expression du phénotype étudié.

Segregation analysis

Remerciements

Ce travail n'aurait été possible que par le dévouement de l'équipe d'Entomologie du Centre Muraz de Bobo-Dioulasso que nous remercions particulièrement. L'équipe est trop nombreuse pour être citée au complet, nous ne citerons que D. Traoré, A. Bicaba, M. Sanou et P. Hien pour leur contribution inestimable.

Nous remercions sincèrement les différentes familles de Bobo-Dioulasso qui ont participé avec enthousiasme et constance au travail ainsi que les autorités sanitaires du Burkina Faso pour leur soutien permanent.

Ce travail a été financé par le ministère de la Coopération et du Développement, l'AUPELF-UREF (LAF 303) et l'Université de la Méditerranée.

Yves Traoré a été boursier du ministère de la Coopération et du Développement et de l'AUPELF-UREF. Christophe Aucan est boursier du ministère de la Recherche et des Technologies.

Références

1. Butler D, Maurice J, O'Brien C. Time to put malaria control on global agenda. *Nature* 1997 ; 386 : 535-6.
2. Mendis KN, Carter R. Clinical disease and pathogenesis in malaria. *Parasitol Today* 1995 ; 11 : 1-16.
3. Stevenson MM, Lyanga JJ, Skamene E. Muri-ner malaria : genetic control of resistance to *P. chabaudi*. *Infect Immun* 1982 ; 38 : 80-8.
4. Fortin A, Belouchi A, Tam MF, et al. Genetic control of blood parasitemia in mouse malaria maps to chromosome 8. *Nature Genetics* 1997 ; 17 : 382-3.
5. Hill AVS. Genetic susceptibility to malaria and other infectious diseases : from the MHC to the whole genome. *Parasitol* 1996 ; 112 : S75-84.
6. Miller LH. Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Africans and African Americans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 2415-9.
7. Nagel RL, Roth EF. Malaria and red cell genetic defects. *Blood* 1989 ; 74 : 1213-21.
8. Ruwende C, Fhoo SC, Snow RW, et al. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 1995 ; 376 : 246-9.
9. 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.
10. McGuire W, Hill AVS, Allsopp CEM, et al. Variation in the TNF α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994 ; 371 : 508-11.
11. Trape JF, Peelman B, Morault Peelman E. Criteria for diagnosing clinical malaria among semi-immune population exposed to intense and perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985 ; 79 : 435-42.
12. Rogier C, Commenges D, Trape JF. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *P. falciparum* parasitemia in highly endemic populations. *Am J Trop Med Hyg* 1996 ; 54 : 613-9.
13. Sjöberg K, Lepers JP, Raharimalala L, et al. Genetic regulation of human anti-malarial antibodies in twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 2101-4.
14. Jepson A, Banya W, Sisay-Joof F, et al. Quantification of the relative contribution of major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC genes to human immune response to foreign antigens. *Infect Immun* 1997 ; 65 : 872-6.
15. Bonney GE. On the statistical determination of major gene mechanisms in continuous human traits : regressive models. *Am J Hum Genet* 1984 ; 18 : 731-49.
16. Burkot TR, Williams JL, Schneider I. Identification of *Plasmodium falciparum* infected mosquitoes by a double antibody enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 1983 ; 783-8.
17. Chippaux JP, Massougbodji A. Description d'une méthode simple de mesure de la paratémie palustre. *Cahiers Santé* 1991 ; 1 : 324.
18. Vignal A, Gyapay G, Hazan J, et al. A novel radioactive multiplex procedure for genotyping of microsatellite markers. In : Adolph KW, et al. *Methods in molecular genetics 1 : Gene and chromosome analysis*. San Diego : Academic press, 1993 ; 211-21.

19. Haseman JK, Elston RC. The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet* 1972 ; 2 : 3-19.

20. Kruglyak L, Lander E. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 1995 ; 57 : 439-54.

21. Gazin P, Robert V, Cot M, Carneval P. Longitudinal study of malaria indices in two villages of the Bobo-Dioulasso region. *Ann Soc Belg Med Trop* 1985 ; 65 : 181-6.

22. Modiano D, Petrarca V, Sirima BS, et al. Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in west African sympatric ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 13206-11.

23. Carnevale P, Bosseno MF, Lallemand M, et al. Le paludisme à *P. falciparum* et le gène de la drépanocytose en République populaire du Congo. I. Relation entre la parasitémie et le trait drépanocyttaire à Djoumouna (région de Brazzaville). *Ann Genet* 1981 ; 24 : 100-4.

24. Chippaux JP, Massougbdji A, Castel J, et al. *P. falciparum* or *P. malaria* parasitemia in carrier of sickle trait in various Benin biotypes. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1992 ; 49 : 246-51.

25. Abel L, Cot M, Mulder L, Carnevale P, Feingold J. Segregation analysis detects a major gene controlling blood infection levels in human malaria. *Am J Hum Genet* 1992 ; 50 : 1308-17.

26. Garcia A, Cot M, Chippaux JP, et al. Genetic control of blood infection levels in human malaria: evidence for a complex genetic model. *Am J Trop Med Hyg* 1998 ; 58 : 480-8.

27. Rihet P, Abel L, Traoré Y, et al. Human malaria: segregation analysis of blood infection levels in a suburban and a rural area in Burkina Faso. *Genetic Epidemiol* 1998 ; 15 : 435-50.

28. Rihet P, Traoré Y, Abel L, et al. Human malaria: *Plasmodium falciparum* blood infection levels are linked to chromosome 5q31-33. *Am J Hum Genet* 1998 ; 63 : 498-506.

29. Troye-Blomberg M, Berzins K, Perlmann P. T cell control of immunity to asexual blood stages of the malaria parasite. *Crit Rev Immunol* 1994 ; 14 : 131-55.

30. Chandrasekharappa SC, Rebelsky MS, Firak TA, et al. A long-range restriction map of the interleukin 4 and interleukin 5 linkage region on chromosome 5. *Genomics* 1990 ; 6 : 94-9.

31. Hoffman SL, Crutcher JM, Puri SK, et al. Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin 12. *Nature Medicine* 1997 ; 3 : 80-3.

32. Postma DS, Bleeker ER, Amelung PJ, et al. Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coincherited with a major gene for atopy. *N Engl J Med* 1995 ; 333 : 894-900.

33. Marsh D, Neely JD, Breazeale DR, et al. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum Immunoglobulin E concentrations. *Science* 1994 ; 264 : 1152-6.

34. Marquet S, Abel L, Hillaire D, et al. Genetic localisation of a locus controlling the intensity of infection by *S. mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nature Genetics* 1996 ; 14 : 181-4.

35. Müller-Myhsok B, Stelma FF, Guissé-Sow F, et al. Further evidence suggesting the presence of a locus, on human chromosome 5q31-33, influencing the intensity of infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Hum Genet* 1997 ; 61 : 452-4.

Résumé

Mots clés : *Plasmodium falciparum*, paludisme, niveaux d'infection, accès palustres, maladies multifactorielles, Afrique.

Le rôle des facteurs génétiques de l'hôte dans le contrôle de l'infection palustre a été clairement établi dans les modèles animaux. Chez l'homme, des résultats de plus en plus nombreux sont en faveur d'un contrôle génétique du paludisme.

Dans une population de la ville de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso), nous avons mis en évidence, par une analyse de ségrégation réalisée sur le phénotype charge parasitaire sanguine, l'existence d'un fort effet génétique. Nos données ne sont pas compatibles avec l'existence d'un gène majeur et sont donc en faveur d'un contrôle polygénique de la charge parasitaire. L'influence de cet effet génétique est plus importante chez les enfants que chez les adultes. Une analyse de liaison a alors été réalisée chez les enfants et a mis en évidence une liaison entre le phénotype et la région q31-33 du chromosome 5. Dans cette région est localisé un gène que nous avons dénommé *Pfil 1* (*Plasmodium falciparum* infection levels 1) qui explique presque 50 % de la variance de la charge parasitaire sanguine et joue un rôle fondamental dans le contrôle de l'infection. Cette région 5q31-33 contient de nombreux gènes codant pour des cytokines régulant les lymphocytes T.

L'identification des gènes contrôlant l'infection palustre ouvre de nouvelles voies pour le développement de stratégies préventives et thérapeutiques. Il devrait être possible dans un proche avenir d'identifier les individus à risque, individus qui pourront bénéficier en priorité des mesures préventives et thérapeutiques. Enfin, une meilleure connaissance de l'effet de ces gènes contrôlant les réponses immunitaires protectrices est d'un intérêt majeur pour le développement de vaccins.

Summary

Analysis of the genetic factors controlling malarial infection in man

Y. Traoré, P. Rihet, T. Traoré-Leroux, et al.

Key words: *Plasmodium falciparum*, malaria, level of infection, bout of malaria, multifactorial diseases, Africa.

Genetic factors have clearly been shown to play a role in controlling malarial infection in animal models. There is now also increasing evidence for the genetic control of malaria in man.

We carried out a segregation analysis based on blood parasite load phenotype for a population of the town of Bobo-Dioulasso (Burkina-Faso). This analysis demonstrated a strong genetic effect. Our results were not consistent with the segregation of a major gene and thus suggest that parasite load is under the control of minor genes. The genetic effect was stronger in children than in adults. We carried out a regression analysis in children and found that there was an association between the phenotype for blood parasite load and the q31-33 region of chromosome 5. We identified a gene in this region, *Pfil1* (*Plasmodium falciparum* infection levels 1), which accounted for almost 50% of the variance in blood parasite load and which played a fundamental role in the control of infection. The 5q31-33 region contains several genes encoding cytokines that regulate T lymphocytes.

The identification of genes controlling malarial infection opens up new possibilities for preventive and treatment strategies. It should be possible in the near future to identify individuals at risk of malaria, who would derive the greatest benefit from preventive and therapeutic measures. Finally, a deeper understanding of these genes controlling protective immune responses could be of value for the development of vaccines.

Cahiers Santé 1999 ; 9 : 53-9.