

Cohortes et biothèques pour l'étude du paludisme en milieu tropical

Cohorts and bio-libraries for studying malaria in tropical areas

C. ROGIER^(1,2), A. TALL⁽¹⁾, J. FAYE⁽¹⁾, M. GUILLOTE⁽³⁾, C. BLANC⁽³⁾, J.-F. TRAPE⁽⁴⁾, A. SPIEGEL^(1,2), L. MARRAMA⁽¹⁾, P. NABETH⁽¹⁾, D. FONTENILLE⁽⁴⁾, P. DRUILHE⁽³⁾, O. PUJALON⁽³⁾

(1) Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Sénégal.

(2) Unité de Parasitologie, IMTSSA, Parc du Pharo, BP 46, 13998 Marseille-Armées, France. Email : christophe.rogier@wanadoo.fr
(Tirés à part : C. Rogier)

(3) Institut Pasteur, Paris, France.

(4) Institut de Recherche pour le Développement, Dakar, Sénégal.

The relationship between Plasmodium transmission, infection, morbidity, genetic susceptibility and acquisition of natural immunity is studied among two cohorts in the Senegalese villages of Dielmo (300 inhabitants) and Ndiop (350 inhabitants) where malaria is holoendemic (about 200 P. falciparum infective bites/person/year) and mesoendemic (about 20 P. falciparum infective bites/person/year), respectively. The populations are under a daily active clinical survey. Blood samples are collected at least once per month. Plasma and red blood cells are stored in bio-libraries that allow longitudinal studies of the immune responses against plasmodial antigens and the investigation of the natural history of P. falciparum infections by molecular genotyping methods.

Bank of biological material. Cohort. Tropical area. Malaria.

Les relations entre la transmission des Plasmodium, les infections, la morbidité, les facteurs génétiques de susceptibilité et l'acquisition d'une immunité naturelle anti-palustre sont étudiées au sein de deux cohortes dans les villages de Dielmo (300 habitants) et de Ndiop (350 habitants), Sénégal, où le paludisme est respectivement holoendémique (environ 200 piqûres infectées par P. falciparum par personne et par an) et mésoendémique (environ 20 piqûres infectées par P. falciparum par personne et par an). Les populations sont suivies cliniquement, à domicile, tous les jours. Des échantillons de sang sont collectés au moins une fois par mois. Le plasma et les culots hématocytaires sont conservés dans des biothèques qui permettent l'étude longitudinale des réponses immunes contre des antigènes plasmodiaux et de l'histoire naturelle des infections à P. falciparum à l'aide de méthodes de génotypage moléculaire.

Biothèque. Cohorte. Milieu tropical. Paludisme.

INTRODUCTION

Responsable de 1,5 à 2,7 millions de morts par an dans le monde, le paludisme constitue un problème majeur de santé publique dans la plupart des zones intertropicales. Il est essentiellement dû à un hématozoaire, parasite des hématies, *Plasmodium falciparum* [1]. Les autres espèces plasmodiales infectant l'homme, *P. vivax*, *P. ovale* et

P. malariae, sont responsables d'une morbidité moindre et n'entraînent pratiquement pas de mortalité. L'Afrique sub-saharienne concentre plus de 90 % des cas et des décès dus au paludisme à *P. falciparum*. Sur ce continent où la transmission est la plus élevée et le paludisme est le plus stable, les espoirs des tentatives d'éradication des années 1950 ont été déçus. L'augmentation actuelle de la résistance de *P. falciparum* à la plu-

part des médicaments antipaludiques rend la prophylaxie et le traitement du paludisme de plus en plus difficiles à mettre en œuvre et augmente son poids sanitaire [2]. La nécessité de nouvelles stratégies de lutte est évidente et l'utilisation d'un vaccin efficace serait particulièrement adaptée au contexte africain. Leur mise au point suppose d'avoir une connaissance précise et approfondie du paludisme.

Paradoxalement, les efforts de recherche sur son histoire naturelle, sur les relations entre la transmission par les anophèles, l'infection plasmodiale, la morbidité et la mortalité, sur les mécanismes d'acquisition d'une immunité anti-palustre naturelle et sur ses cibles antigéniques ont rarement été à la hauteur des défis posés tant en terme de santé publique qu'en terme de complexité de cette parasitose.

La méconnaissance de la complexité et de l'évolution des infections plasmodiales chez un individu, l'absence d'indicateur clair de l'immunité anti-palustre, l'ignorance des mécanismes immunologiques impliqués et de l'impact des variations de la transmission ou de l'infection sur cette immunité à moyen ou à long terme rendent difficile la mise au point d'un vaccin et l'évaluation des mesures de lutte.

DES SUIVIS DE COHORTE POUR L'ÉTUDE DE L'HISTOIRE NATURELLE DU PALUDISME ET DE L'ACQUISITION D'UNE IMMUNITÉ ANTI-PALUSTRE

PROGRAMME ET TYPES D'ÉTUDES

En 1989, l'Institut Pasteur (Paris), l'Institut Pasteur de Dakar et l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD, ex-ORSTOM) ont lancé un programme d'étude de l'acquisition de l'immunité anti-palustre, de mise au point d'un vaccin antipaludique et d'étude des interactions entomologiques, parasitologiques, immunologiques et cliniques [3, 4]. L'originalité de ce programme réside dans son approche multidisciplinaire et dans l'analyse intégrée des résultats. Ce programme implique une évaluation de la transmission, le recueil de données parasitologiques et cliniques au niveau individuel et la réalisation répétée de prélèvements sanguins permettant l'analyse des réponses immunologiques en rela-

tion avec les données entomologiques, parasitologiques et cliniques. Pour cela les études sont prospectives, longitudinales, continues sur plusieurs années, exhaustives et le recueil des données est systématique, actif et, autant que possible, permanent. Elles concernent la totalité de populations exposées à des niveaux différents de transmission mais, chacune, relativement homogène en terme d'exposition. Dans ces populations, le recueil de données entomologiques, parasitologiques, cliniques et immunologiques est conçu pour permettre d'aborder de façon intégrée un grand nombre de questions et d'apporter des réponses pertinentes dans le cadre d'un seul et même suivi de populations. Il s'agit par exemple d'évaluer des réponses immunologiques et d'identifier les différentes populations de *P. falciparum*, avant, pendant et après les accès palustres, principale manifestation clinique du paludisme. Il s'agit aussi de mesurer les variations des réponses immunologiques en fonction de la transmission, de l'âge et de l'acquisition progressive d'une immunité. Il s'agit enfin d'identifier des facteurs génétiques associés à la sensibilité au paludisme ou aux réponses immunologiques.

CADRE DES ÉTUDES

Pour ce programme, les populations de deux villages du Sénégal sont suivies respectivement depuis juin 1990 et juillet 1993 : la population de Dielmo (250 à 300 habitants) où le paludisme à *P. falciparum* est holo-endémique (taux de prévalence parasitaire > 75 % chez les nourrissons) et où sa transmission est intense et pérenne, de l'ordre de 200 piqûres infectées par personne et par an, et la population de Ndiop (à 5 km de Dielmo, 300 à 350 habitants) où le paludisme est méso-endémique (taux de prévalence parasitaire compris entre 11 et 50 % chez les enfants âgés de 2 à 9 ans) et où sa transmission est modérée et strictement saisonnière, de l'ordre de 20 piqûres infectées par personne et par an [3-7]. Le suivi de ces populations continue encore en décembre 2002.

Des stations de recherche comprenant un laboratoire, une salle de consultation et des locaux d'habitation ont été construites dans chaque village. Elles permettent la présence permanente, 365 jours par an, 24 heures sur 24, d'une équipe composée d'au moins un médecin et un infirmier-technicien.

ASPECTS ÉTHIQUES

Les protocoles appliqués dans ces populations sont soumis et acceptés par le conseil de perfectionnement de l'Institut Pasteur de Dakar qui est présidé par le Ministre chargé de la Santé au Sénégal et par un comité d'éthique local. Depuis octobre 2000, un Conseil National de Recherches en Santé a été créé au Ministère de la Santé du Sénégal. Il comprend 2 structures, un Conseil Scientifique et un Comité d'Éthique National. Désormais, tous les projets lui seront soumis. Les protocoles sont longuement expliqués aux villageois au cours d'assemblées de l'ensemble de la population et au cours d'entretiens particuliers organisés dans chaque maisonnée. Ces réunions et entretiens ont lieu au moins une fois par an et portent sur les résultats des recherches obtenus précédemment, sur les objectifs et les motivations des recherches envisagées dans l'avenir, sur le nombre, la nature, le volume et la fréquence des prélèvements, et sur les contraintes du suivi entomologique et clinique. L'accord informé oral de chaque villageois ou de son tuteur légal est ensuite obtenu au moins une fois par an, en présence de témoins indépendants (maîtres d'écoles). Les villageois acceptent que les prélèvements servent pour la recherche médicale en général et sur le paludisme en particulier, mais aussi pour des tests de dépistage, par exemple ceux des infections à VIH. Les personnes séropositives pour les VIH (< 1% des populations) bénéficient d'un suivi clinique particulier, d'une assistance psychologique et de traitements adaptés. Les villageois peuvent à tout moment sortir de l'étude en continuant de bénéficier du soutien sanitaire en cas d'urgence médicale.

PROCÉDURE D'INCLUSION

À son inclusion, chaque villageois bénéficie d'un examen clinique complet, d'un examen parasitologique des selles, d'examens biochimiques et parasitologiques des urines, d'une numération-formule sanguine, d'une détermination du groupe sanguin et des groupes HLA, d'une électrophorèse de l'hémoglobine à la recherche d'une hémoglobinopathie, de l'évaluation de la glucose-6-phosphate déhydrogénase (G6PD). Les maladies identifiées sont traitées. Un interrogatoire porte sur leur histoire passée et particulièrement sur leurs lieux de résidence pour évaluer leur exposition

antérieure au paludisme. Cette évaluation repose sur une cartographie de l'endémie palustre réalisée à partir d'une revue des travaux paludométriques effectués au Sénégal depuis les années 30. En particulier, les résultats des enquêtes menées à l'époque des tentatives d'éradication par le Service de Lutte Anti-Paludique (SLAP) de Thiès ont été reportés sur une carte. Il est ainsi possible de classer chaque village et chaque arrondissement en zone hypo-, méso-, hyper- ou holoendémique et d'utiliser ces informations pour construire de façon rétrospective des matrices d'exposition.

SUIVI ENTOMOLOGIQUE

Dans chacun des deux villages, le niveau de transmission est évalué par capture de moustiques se posant sur homme avec un effort moyen de 4 homme-nuits de capture par semaine [6, 7]. Quatre postes de capture, deux à l'intérieur et deux à l'extérieur d'habitations, sont tenus chacun par deux hommes adultes qui se relaient toute la nuit pour capturer les moustiques se posant sur leurs jambes découvertes jusqu'aux genoux. La proportion d'anophèles infectés est estimée par la détection immuno-enzymatique de l'antigène circulaire sporozoitaire des espèces plasmodiales prévalentes (*P. falciparum*, *P. ovale* et *P. malariae*). Le nombre de piqûres infectées reçues par la population est estimé par le produit du nombre d'anophèles vecteurs capturés sur homme et de la proportion d'infectés parmi ces vecteurs.

SUIVI CLINIQUE ET PRISE EN CHARGE DES MALADES

La surveillance clinique repose sur des visites quotidiennes (si nécessaire, trois fois par jour), domiciliaires, de chacun des habitants inclus dans l'étude, par des enquêteurs villageois. Au cours de ces visites, la présence et l'état de santé des individus sont notés. À l'occasion d'études particulières, par exemple chez les enfants âgés de moins de 2 ans ou chez l'ensemble de la population au cours des premiers mois de suivi, le recueil des données porte aussi sur la température corporelle et sur une série de signes ou de symptômes.

Lorsqu'un épisode pathologique est détecté, une fiche clinique standardisée est remplie immédiatement. Les questionnaires ont été mis au point après une étude ethno-linguistique, par la méthode des « focus-groups », de la perception

des signes et des symptômes dans les deux populations et avec l'aide de linguistes. Les villageois ont aussi accès, jour et nuit, aux stations de recherche pour consulter. Dans les cas de fièvre, des gouttes épaisses et un prélèvement de sang capillaire sont effectués. Chaque malade détecté est vu et examiné par un médecin. À l'issue de la consultation et en fonction du résultat de la lecture microscopique de la goutte épaisse, un diagnostic est porté et un traitement est prescrit en respectant les recommandations nationales. Les médicaments sont administrés par les infirmiers ou les enquêteurs, trois fois par jour. La surveillance de l'évolution clinique dure jusqu'à la guérison. Les cas graves nécessitant une hospitalisation sont évacués par la route jusqu'à l'hôpital régional de Kaolack (1 heure 30 min) ou les hôpitaux de Dakar (4 heures).

SUIVI PARASITOLOGIQUE SYSTÉMATIQUE ET GESTION DES DONNÉES PARASITOLOGIQUES

Avec une fréquence habituelle d'une fois par mois qui peut être portée à deux fois par semaine au cours de périodes de suivi intensif, des gouttes épaisses sont effectuées à titre systématique dans l'ensemble des populations pour la surveillance parasitologique des infections plasmodiales asymptomatiques.

Les gouttes épaisses, toujours faites en deux exemplaires, sont colorées dans les stations de recherche et sont rangées, deux par place, dans des boîtes de 100 places. Les gouttes épaisses effectuées à titre systématique sont rangées par ordre de numéro d'identification des villageois dans une série de trois ou quatre boîtes, respectivement à Dielmo et à Ndiop, chaque série correspondant à un recueil systématique. Les gouttes épaisses effectuées à l'occasion d'un épisode pathologique sont conservées dans des boîtes séparées et rangées par ordre de date. Après une lecture effectuée au moment d'un épisode pathologique pour porter un diagnostic, toutes les gouttes épaisses font l'objet d'une lecture de référence, dans le laboratoire de paludologie de l'IRD de Dakar [5, 8], par deux techniciens dont la sensibilité et la spécificité de la lecture sont équivalentes. Les résultats des lectures sont enregistrés sur des cahiers puis sont saisis dans la base de données du laboratoire d'épidémiologie de l'Institut Pasteur de Dakar. La date, le numéro d'iden-

tification de l'individu et le numéro séquentiel du prélèvement permettent de mettre en relation les résultats parasitologiques et les examens effectués sur les prélèvements de sang.

CONSTITUTION D'UNE BIOTHÈQUE

Prélèvements de sang capillaire

La surveillance parasitologique mensuelle est couplée au prélèvement simultané de sang capillaire au bout du doigt. Ces prélèvements systématiques sont effectués dans des tubes capillaires en verre d'un volume de 500 µl avec du citrate de sodium comme anticoagulant. Tous les matériels de prélèvement sont stériles et à usage unique. Le sang collecté au cours de ces collectes systématiques comme à l'occasion d'un épisode pathologique est sédimenté. Sous une hotte et dans le cône de protection d'une flamme, le plasma (environ 300 µl) est séparé en deux aliquotes égaux dans des tubes Eppendorf (0,5 mL). Le culot globulaire est recueilli dans un cryotube NUNC® de 2 mL à vis après avoir éliminé, au moins en partie, la couche leucocytaire. Les culots globulaires sont congelés immédiatement, sur le terrain, en azote liquide dans des contenants présents dans les stations de recherche. Ces contenants sont ramenés dans le laboratoire d'épidémiologie de l'Institut Pasteur de Dakar une fois par mois. Les culots sont alors transférés dans des congélateurs à -20 °C avant d'être expédiés dans le laboratoire d'immunologie moléculaire des parasites de l'Institut Pasteur à Paris où ils sont conservés à -80 °C. Les plasmas sont conservés à +4 °C dans un réfrigérateur à gaz ou solaire jusqu'à leur transport, moins d'une semaine après leur prélèvement, au laboratoire d'épidémiologie de l'Institut Pasteur de Dakar où ils sont congelés à -20 °C. Un des deux aliquotes est conservé à Dakar, l'autre est expédié au laboratoire de parasitologie médicale de l'Institut Pasteur à Paris où ils sont conservés à -20 °C. Les deux aliquotes de plasma et les culots globulaires sont rangés par ordre de numéro séquentiel dans des boîtes en carton de 100 places permettant de les retrouver en quelques minutes et de vérifier rapidement leur état.

Prélèvements de sang veineux

Des prélèvements de sang veineux sont effectués par des médecins avec une fréquence d'une fois par an, sur l'ensemble de la population, pour

des études d'immunologie cellulaire, de génétique ou pour l'isolement et l'étude de souches de *P. falciparum*. Les volumes de sang et la fréquence des prélèvements sont adaptés à l'âge. Les tubes de sang veineux sont expédiés à Dakar, par la route, en moins de 5 heures, dans une glacière où la température est maintenue autour de 4 à 8 °C par des accumulateurs de froid. Pendant le transport, les tubes sont rangés dans les emplacements de portoirs en polystyrène qui assure une protection thermique et sont placés sur des blocs de mousse pour amortir les chocs et les vibrations. Lorsque ces prélèvements sont exploités à l'Institut Pasteur de Dakar, les aliquotes de plasma, de sérum ou de culot globulaire sont joints aux aliquotes préparés dans les stations de recherche.

Registre des prélèvements

Chaque prélèvement sanguin est enregistré dans les stations de recherche sur un registre en papier spécifique de chaque cohorte et un numéro séquentiel unique dans chaque cohorte lui est attribué. Le registre contient ce numéro, la date, le numéro d'identification du villageois, ses nom et prénom, le nombre et la nature du prélèvement (capillaire, veineux sur tube ACD, sur tube hépariné, sur tube sec ou sur tube EDTA), le motif du prélèvement et éventuellement l'heure du prélèvement. Si le sang est aliquoté sur place, le nombre et le volume des aliquotes de plasma ainsi que l'existence d'un culot globulaire sont notés. Pour les capillaires, les registres comprennent aussi une estimation de l'hématocrite. Les données de ces registres sont saisies à Dakar, à l'Institut Pasteur, dans des bases de données informatisées spécifiques de chaque cohorte, gérées par le logiciel 4e Dimension® (ACI™, Paris, France).

Accès aux bases de données

Lorsqu'un chercheur a besoin d'utiliser un prélèvement, les informations nécessaires lui sont fournies par un des épidémiologistes de l'Institut Pasteur de Dakar. Les données lui sont confiées sous une forme anonyme. Les noms et prénoms des personnes sont effacés. Seuls le numéro séquentiel du prélèvement, sa date et le numéro d'identification des villageois sont utilisés. Un numéro séquentiel de prélèvement correspond généralement à une seule combinaison de numéro d'identification de villageois et de date. Cela constitue un moyen de contrôle de

l'identité des prélèvements et permet de corriger d'éventuelles erreurs de saisie ou de transcription. Lorsque plusieurs prélèvements ont été effectués sur la même personne le même jour, son numéro, l'heure et le type de prélèvement mentionnés sur le registre et informatisés permettent de les différencier.

RÉSULTATS

À Dielmo (11 années de suivi ; juin 1990-mai 2001) et à Ndiop (8 années de suivi ; juillet 1993-juin 2001), respectivement 249 et 362 personnes ont été incluses pendant les 15 premiers jours de suivi, 116 et 92 enfants ont été inclus à leur naissance et 200 et 302 immigrants ont été inclus à leur arrivée dans les villages. Pendant les mêmes périodes d'étude, parmi les 565 et 756 personnes suivies à un moment donné respectivement à Dielmo ou à Ndiop, 36 et 16 sont décédées (dont respectivement 5 et 4 hors des villages), 54 et 69 ont refusé de continuer à participer à l'étude (dont respectivement 36 et 22 moins d'un an après leur inclusion) et 161 et 209 ont quitté les villages pour des raisons familiales ou professionnelles. Au 1^{er} juin 2001 à Dielmo et au 1^{er} juillet 2001 à Ndiop, respectivement 314 et 462 personnes étaient incluses dans l'étude (dont 42 et 161 étaient momentanément absentes). Aux mêmes dates, respectivement à Dielmo et à Ndiop, les 565 et 756 individus inclus à un moment donné ont totalisé 1 025 543 et 863 789 personne-jours de suivi. Parmi ces personnes, respectivement 78 % et 72 % avaient été présentes dans les villages et sous surveillance clinique pendant plus de 66 % de leurs temps d'inclusion. En d'autres termes, seulement 22 % et 28 % des personnes incluses ont passé moins des deux tiers de leur temps à Dielmo et à Ndiop. Ce dernier village accueille plus de travailleurs agricoles qui restent pour une saison ou quelques années mais qui sont cependant susceptibles d'être inclus dans l'étude.

Les nombres de prélèvements collectés et conservés, généralement sous forme de 2 aliquotes de plasma et d'un culot globulaire, étaient de 46 820 dans la biothèque de Dielmo au 1^{er} juin 2001 et de 33 419 dans celle de Ndiop au 1^{er} juillet 2001.

De nombreux travaux ont été effectués ou sont en cours à partir des prélèvements rassemblés dans les biothèques des cohortes de Dielmo et de Ndiop. Ces travaux concernent l'analyse génotypique des populations parasitaires infectant les habitants des villages [9-17]. Ils concernent aussi les réponses anticorps contre différents antigènes parasitaires et leur association à l'immunité clinique ou anti-parasitaire [18-24]. Des prélèvements ont occasionnellement servi à la surveillance de la circulation d'arboviroses (H. Zeller, Institut Pasteur, communication personnelle).

DISCUSSION

Le principal intérêt des biothèques de Dielmo et de Ndiop est de permettre aux chercheurs d'avoir accès à des échantillons sanguins provenant de personnes dont le statut clinique et l'histoire paludologique sont parfaitement connus. Aucune autre biothèque associée à une base de données cliniques et épidémiologiques comparable n'est actuellement disponible.

La constitution et l'utilisation de ces biothèques posent cependant différents problèmes. Les échantillons prennent une place très importante (2 congélateurs à -80°C et 8 congélateurs -20°C à l'Institut Pasteur à Paris, 5 congélateurs à -20°C à l'Institut Pasteur de Dakar) et leur conservation coûte cher (prix d'un congélateur à -80°C de l'ordre de 8 400 €). Seule une petite partie a été utilisée. Leur exploitation est limitée par le coût de la main d'œuvre et des réactifs. La conservation des plasmas à moyen ou long terme est délicate. Les tubes Eppendorf utilisés pour les plasmas ne sont pas complètement étanches et les échantillons sont soumis à la dessiccation. Les contraintes financières ont empêché jusqu'à présent l'emploi de tubes à vis de plus faible volume qui limiteraient ce problème. À -20°C , la conservation à moyen ou long terme de l'ADN parasite contenu dans les culots globulaires n'est pas assurée; elle nécessite des températures inférieures ou égales à -80°C . L'utilisation des échantillons par des équipes distinctes dispersées sur des sites différents pose des problèmes de coordination et peut être à l'origine de conflits. La diversité des formats des résultats obtenus au cours des études immunologiques a aussi gêné, jusqu'à pré-

sent, leur enregistrement dans une base de données commune.

Un comité de pilotage a été constitué pour gérer l'utilisation des prélèvements et coordonner les travaux menés sur ces deux cohortes. Un effort est effectué actuellement pour rassembler les résultats immunologiques obtenus par différentes équipes sous un format informatisé commun. Au niveau du terrain, l'accord des villageois devrait devenir écrit dans un avenir proche.

Les motivations pour poursuivre ces suivis de cohorte ne sont pas toujours bien perçues. Dans le cadre des appels d'offre pour le financement de la recherche, il devient particulièrement difficile de justifier ce type de recueil de données et de matériel biologique: les demandes de financement actuelles impliquent la définition d'objectifs ponctuels accessibles en peu de temps, rarement plus de deux ans. Dans ces conditions, il devient pratiquement impossible de faire financer le coût de la collecte itérative de matériels biologiques chez les mêmes individus pendant plus d'une dizaine d'années. Or, c'est généralement le délai minimum nécessaire à l'acquisition d'une immunité palustre comparable à celle des adultes les mieux protégés. L'étude de la diversité des modes d'acquisition de l'immunité par des études longitudinales et la constitution de biothèques en milieu tropical se heurte à l'organisation actuelle du financement de la recherche.

REMERCIEMENTS: Nous sommes reconnaissants aux villageois de Dielmo et de Ndiop pour leur participation à ces études, au Pr. L. Pereira da Silva qui a joué un rôle essentiel à l'origine de ce programme, aux enquêteurs, techniciens, infirmiers, médecins et chercheurs, notamment ceux de l'Institut Pasteur de Dakar et de l'IRD, dont le travail a permis la constitution et l'exploitation des biothèques et aux autorités universitaires, médicales et civiles sénégalaises pour leur soutien et leurs conseils dans la mise en place des cohortes. Ces travaux ont bénéficié de financements des Ministères français de la Recherche et de l'Enseignement et de la Coopération. Une part importante des financements du suivi des cohortes et de la constitution des biothèques vient de l'Institut Pasteur et particulièrement de l'Institut Pasteur de Dakar, sur fonds propres.

RÉFÉRENCES

1. WHO. World malaria situation in 1994. *Wkly Epidemiol Rec* 1997; 72: 269-74.

2. Trape JF, Pison G, Preziosi MP, Enel C, Desgrées du Loû A, Delaunay V, *et al.* Impact of chloroquine resistance on malaria mortality. CR Acad Sci, Paris III 1998; 321: 689-97.
3. Rogier C, Trape JF. Étude de l'acquisition de la pré-munition en zones d'holo et de mésoendémie palustre à Dielmo et à Ndiop (Sénégal): Résultats préliminaires, 1990-1994. Med Trop 1995; 55: 71S-6S.
4. Rogier C, Tall A, Diagne N, Fontenille D, Spiegel A, Trape JF. *Plasmodium falciparum* clinical malaria: lessons from longitudinal studies in Senegal. Parasitologia 1999; 41: 255-9.
5. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, *et al.* The Dielmo project: A longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. Am J Trop Med Hyg 1994; 51: 123-37.
6. Fontenille D, Lochouam L, Diatta M, Sokhna C, Dia I, Diagne N, *et al.* Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91: 647-52.
7. Fontenille D, Lochouam L, Diagne N, Sokhna C, Lemasson JJ, Diatta M, *et al.* High annual and seasonal variations in malaria transmission by anophelines and vector species composition in Dielmo, a holoendemic area in Senegal. Am J Trop Med Hyg 1997; 56: 247-53.
8. Trape JF. Rapid evaluation of malaria parasite density and standardization of thick smear examination for epidemiological investigations. Trans R Soc Trop Med Hyg 1985; 79: 181-4.
9. Contamin H, Fandeur T, Rogier C, Bonnefoy S, Konate L, Trape JF, *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: 632-43.
10. Bottius E, Guanzirulli A, Trape JF, Rogier C, Konate L, Druilhe P. Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by polymerase chain reaction. Trans R Soc Trop Med Hyg 1996; 90: 15-9.
11. Daubersie P, Sallenave-Sales S, Magne S, Trape JF, Contamin H, Fandeur T, *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.
12. 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: 81-8.
13. 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: 581-92.
14. Konate L, Zwetyenga J, Rogier C, Bischoff E, Fontenille D, Tall A, *et al.* Variation of *P. falciparum* MSP-1 block 2 and MSP-2 allele prevalence and infection complexity in two neighbouring Senegalese villages with different transmission conditions. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93 (Suppl 1): 21-8.
15. Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, *et al.* No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 726-35.
16. Zwetyenga J, Rogier C, Spiegel A, Fontenille D, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. A cohort study of *Plasmodium falciparum* diversity during a non transmission season in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93: 375-80.
17. Schleiermacher D, Rogier C, Spiegel A, Tall A, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. Increased multiplicity of *Plasmodium falciparum* infections and skewed distribution of individual MSP1 and MSP2 alleles during pregnancy in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. Am J Trop Med Hyg 2001; 64: 303-9.
18. Thomas AW, Narum D, Waters AP, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, *et al.* Aspects of immunity for the AMA-1 family of molecules in humans and non-human primates malarials. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89 Suppl 2: 67-70.
19. Thomas AW, Trape JF, Rogier C, Goncalves A, Rosario VE, Narum DL. High prevalence of natural antibodies against *Plasmodium falciparum* 83-kilodalton apical membrane antigen (PF83/AMA-1) as detected by capture-enzyme-linked immunosorbent assay using full-length baculovirus recombinant PF83/AMA-1. Am J Trop Med Hyg 1994; 51: 730-40.
20. Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, *et al.* Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). Am J Trop Med Hyg 1996; 54: 449-57.
21. Nguer CM, Diouf A, Diallo TO, Dieye A, Tall A, Diouf B, *et al.* Anticorps spécifiques d'antigènes de *Plasmodium falciparum* chez les sujets immuns. II - Criblage des réponses vis-à-vis d'un antigène majeur de la surface des merozoïtes (MSP1). Dakar Med 1997; 42: 106-10.

22. Perraut R, Berthe P, Diouf B, Tall A, Diouf A, Rous-silhon C, *et al.* Anticorps spécifiques d'antigènes de *Plasmodium falciparum* chez les sujets immuns. I - Comparaison de méthodes de détection/titration. Dakar Med 1997 ; 42 : 30-5.
23. Oeuvray C, Rogier C, Trape JF, Jepsen S, Druilhe P. Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmo-dium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. Infect Immun 2000; 68: 2617-20.
24. Jouin H, Rogier C, Trape JF, Mercereau-Puijalon O. Fixed, epitope-specific, cytophilic antibody response to the polymorphic block 2 domain of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen MSP-1 in humans living in a malaria-endemic area. Eur J Immunol 2001; 31: 539-50.