

PLACE DE L'EPIDEMIOLOGIE GENETIQUE DANS L'ÉTUDE DES MALADIES INFECTIEUSES. EXEMPLE DU PALUDISME

A. GARCIA, L. ABEL, M. COT, J.-P. CHIPPAUX, J. FEINGOLD

RESUME - Les études d'épidémiologie génétique constituent un nouvel outil dans l'étude du paludisme, avec des retombées intéressantes dans la compréhension des inter-relations hôte/parasite. Elles ont d'ores et déjà permis de conclure à l'existence d'un gène majeur co-dominant à transmission mendélienne contrôlant les niveaux de parasitémie. Cet allèle a une fréquence de 24%, ce qui signifie qu'environ 6% de la population est prédisposée à de fortes parasitémies. Ces études soulignent l'intérêt de prendre en compte l'existence d'une variabilité génétique dans le développement et l'évaluation des programmes de contrôle de la maladie. Elles ouvrent de nouvelles perspectives en thérapeutique et dans l'élaboration de stratégies vaccinales.

MOTS-CLES - Paludisme, épidémiologie génétique.

PLACE OF GENETIC EPIDEMIOLOGY IN THE STUDY OF INFECTIOUS DISEASES. THE EXAMPLE OF MALARIA.

ABSTRACT - Genetic epidemiology is a new tool for the study of malaria, with interesting incidence in the comprehension of host/parasite interrelations. The existence of a co-dominant major gene, with a mendelian transmission, controlling the levels of parasitemia has been found out. This allele has a frequency of 24% which means that about 6% of the population is predisposed to high parasitemias. These studies show the interest to integrate the existence of a genetical variability in the development and the evaluation of malaria control programmes. They are offering new perspectives in therapeutics and in the elaboration of vacinal strategies.

KEY WORDS - Malaria, genetic epidemiology.

Toute forme de vie, végétale ou animale, est sujette à des agressions microbiennes et la survie de chaque espèce dépend en partie de l'existence de certaines formes de résistance. Il existe deux grands types de résistances, la résistance naturelle, ou constitutionnelle, et la résistance acquise. La résistance naturelle d'un hôte potentiel à une infection est liée à un processus physiologique, entraînant une impossibilité de l'agent infectieux à pénétrer ou à se développer dans l'hôte. Elle ne nécessite pas de contact préalable entre l'hôte et l'agent infectieux (1). La résistance acquise est très étroitement liée au système immunitaire et nécessite un premier contact entre l'hôte et le micro-organisme. Avant cette rencontre, l'hôte est démuné de tout moyen de défense spécifique contre cet agent et c'est au cours de ce premier contact que va se déclencher une suite de processus extrêmement complexe qui aboutira, lors des contacts ultérieurs, au déclenchement de la réponse immunitaire spécifique.

- Travail de l'ORSTOM, Département Santé, Paris, France (A.G., MD PhD ; L.A., MD PhD ; M.C., MD PhD ; J.-P.C., MD PhD ; J.F., MD PhD).

- Correspondance : André GARCIA, Département Santé, ORSTOM, 213 rue Lafayette, 75010 Paris, France.

(Med. Trop. 1995 ; 55 : 14S-18S)

Plusieurs méthodes existent pour étudier la variabilité individuelle de cette susceptibilité aux infections. Les études expérimentales sur modèle animal permettent de contrôler tous les éléments, environnement, agent infectieux et hôte, impliqués dans le processus infectieux. Le contrôle génétique de la résistance naturelle aux infections a été largement étudié sur des modèles animaux (2). Le but général de la recherche expérimentale dans le domaine de la susceptibilité génétique aux maladies infectieuses est d'isoler des phénotypes étudiables (comportement face à des infections expérimentales, réponses à des molécules thérapeutiques ou vaccinales...) et de rechercher parmi eux ceux qui sont sous le contrôle de facteurs génétiques. L'animal le plus souvent utilisé en pathologie infectieuse est la souris, qui présente un certain nombre d'avantages, parmi lesquels l'existence d'un système équivalent au système HLA de l'homme, le système H-2.

LES ETUDES SUR L'ANIMAL DE LABORATOIRE

Les parasites du paludisme humain ne parvenant pas à se développer chez les espèces non primates, les études expérimentales sur modèles animaux l'ont été sur les espèces plasmodiales *Plasmodium berghei*, *Plasmodium*



chabaudi et *Plasmodium yoelii*. Plusieurs phénotypes sont étudiés, qu'il s'agisse de phénotypes cliniques (réponses à l'infection primaire comme la parasitémie, la durée de survie, le taux de mortalité) ou de phénotypes biologiques comme la réponse immunitaire. Cette réaction immunitaire a été étudiée secondairement à l'infection expérimentale et en réponse à l'injection de certaines protéines potentiellement vaccinales.

La susceptibilité à l'infection primaire par *Plasmodium chabaudi* varie de manière importante selon la lignée animale utilisée (3). Le même type de variabilité a été mis en évidence pour l'infection par *Plasmodium yoelii*, que ce soit en terme de parasitémie (souche non létale) ou de durée de survie (souche létale) (4). Les études qui ont tenté d'identifier les gènes contrôlant cette susceptibilité/résistance ont souvent donné des résultats discordants. Certaines équipes ont défini la résistance comme étant sous le contrôle d'un gène autosomal dominant (3,5,6), alors que d'autres attribuent cette résistance à un contrôle polygénique (7), avec parfois une influence du sexe : la résistance est plus importante chez les souris femelles et est inhibée par la testostérone (8). Qu'il soit monogénique ou polygénique, ce contrôle génétique met en avant le rôle du complexe H-2, équivalent chez la souris du système HLA de l'homme (9).

La variabilité individuelle de la réponse à certaines protéines vaccinales chez la souris a également été mise en évidence. Le rôle protecteur d'anticorps dirigés contre des antigènes de surface des sporozoïtes a tout d'abord été mis en évidence sur des souris infectées par *Plasmodium berghei* (10). L'incapacité de certaines lignées à produire de tels anticorps a permis de mettre en évidence le rôle du complexe H-2 dans cette réponse : seuls les animaux exprimant certains haplotypes du complexe H-2 peuvent réagir à ce type d'antigène, les autres étant définis comme génétiquement non-répondeurs (11,12). D'autres études ont confirmé ces résultats en utilisant d'autres espèces plasmocytaires (13,14,15) et/ou d'autres antigènes (14,16).

L'ETUDE DE LA SUSCEPTIBILITE INDIVIDUELLE AUX INFECTIONS CHEZ L'HOMME, OU EPIDEMIOLOGIE GENETIQUE

Les études expérimentales sont inapplicables chez l'homme et c'est à partir de l'observation de concentrations familiales de maladies que l'épidémiologie génétique cherche, par des méthodes statistiques, à élucider les mécanismes génétiques impliqués. Ces méthodes, utilisées en épidémiologie génétique des maladies infectieuses, cherchent à isoler parmi l'ensemble des facteurs de risque de ces pathologies, ceux qui ont un fondement génétique. Certaines d'entre elles permettent également d'élucider la nature des facteurs génétiques en cause.

Méthodologie générale de l'épidémiologie génétique

* La démarche générale en épidémiologie génétique

Elle est similaire à celle utilisée habituellement en épidémiologie. Il est nécessaire dans un premier temps de définir précisément la variable que l'on souhaite étudier, c'est-à-dire le phénotype d'intérêt, ainsi que la population sur laquelle va porter l'étude et le type d'enquête que l'on peut réaliser.

Classiquement, on distingue les phénotypes qualitatifs binaires (malade/non malade), souvent définis selon des critères cliniques, des phénotypes quantitatifs (dosage biologique le plus souvent). En infectiologie, cette distinction est difficile à faire : en effet, les manifestations cliniques sont très peu spécifiques d'un micro-organisme (fièvre, diarrhée, toux) ou, si elles le sont (œdème de Calabar, migration sous-conjonctivale d'une filaire, accès palustre pernicieux), leur rareté implique l'inclusion d'un nombre considérable de sujets et surtout ces aspects cliniques ne reflètent pas la réalité de la morbidité de la maladie ni de la prévalence de l'infection. En pratique, le diagnostic est suspecté sur un cortège de signes cliniques et confirmé par la mise en évidence directe du micro-organisme ou par une sérologie. Dans le cadre des maladies infectieuses parasitaires chroniques, on rencontre souvent des sujets porteurs du parasite sans aucune manifestation clinique ou, à l'inverse, des individus cliniquement atteints chez qui la recherche du parasite est vaine. Ces particularités rendent la définition du phénotype très difficile et l'interprétation des résultats d'une enquête doit être très spécifique du phénotype étudié. Une fois ce phénotype précisé, on peut réaliser une enquête sur deux types de populations : une population dite générale composée d'individus non apparentés, et une population constituée de familles. Au sein de chacune de ces populations, on utilise ou non des marqueurs génétiques qui peuvent être anonymes (polymorphismes de l'ADN), ou au contraire avoir une signification biologique particulière.

Les principales applications de l'épidémiologie génétique à l'étude du paludisme se sont concentrées sur deux types d'études, les études en population générale avec utilisation de marqueurs génétiques et les études familiales sans marqueur génétique. Les analyses familiales avec marqueurs génétiques (analyse de liaison génétique) n'ont pas encore été utilisées dans l'étude du paludisme. Néanmoins, étant donné leur importance et leurs implications éventuelles, nous les décrirons rapidement à la fin de ce chapitre.

* Les études en population générale avec marqueur

On pourra s'intéresser à la distribution d'un marqueur dans des groupes d'individus se comportant différemment face à une infection, ou encore réaliser des enquêtes cas-témoins ayant pour objectif de comparer la fréquence d'un marqueur entre un groupe de malades et un groupe de témoins. Ces études ne sont réalisables que pour un marqueur génétique ayant une signification biologique particulière et présentent d'autant plus d'intérêt que le marqueur joue un rôle dans le processus physiologique étudié (groupes sanguins, système HLA pour les phénotypes impliquant une réponse immunitaire par exemple). L'existence d'une fréquence significativement élevée ou abaissée, d'un allèle marqueur parmi les cas, suggère une association positive ou négative entre cet allèle et la maladie. Les enquêtes cas-témoins sont très largement utilisées en épidémiologie et leur application à l'épidémiologie génétique pose quelques problèmes spécifiques, comme le choix des témoins, l'existence d'une interaction entre le génotype du sujet et un facteur environnemental (17) ou encore l'analyse statistique de ces enquêtes (18). Nous allons illustrer ces deux types d'études par des exemples empruntés au paludisme en nous intéressant d'abord à l'étude des anomalies génétiques des héma-

ties dans les populations exposées au paludisme, puis aux résultats d'une large enquête cas-témoins réalisée en Gambie sur l'association entre des antigènes HLA et certaines formes graves de la maladie.

L'analyse de la distribution des anomalies génétiques des globules rouges dans les populations soumises à l'infection palustre a montré de nombreuses associations entre certaines de ces anomalies et un certain degré de résistance vis-à-vis de l'infection. Concernant la drépanocytose, Allison constate dès 1950 l'absence de porteurs d'hémoglobine S parmi les enfants mourant de paludisme (19) et les travaux récents de Hill (20) indiquent qu'une protection de l'ordre de 90% pourrait être conférée par cette anomalie vis-à-vis des accès pernicieux et des anomalies sévères. D'autres anomalies ont été étudiées (21), qu'il s'agisse des hémoglobinoses C ou E (22,23), des thalassémies (24,25) ou des anomalies portant sur les récepteurs membranaires, à l'origine par exemple de la résistance des sujets Duffy négatif à l'infection par *Plasmodium vivax* (21). Les mécanismes impliqués dans ces phénomènes sont encore parfois discutés, bien qu'il semble de plus en plus probable qu'il s'agisse d'une modification de la clairance des hématies infectées (26,27) ou d'une augmentation de la résistance des hématies à l'invasion par des parasites (28). Le rôle du paludisme dans la sélection de ces polymorphismes est probablement très important (29) et il est possible d'estimer, à partir de la fréquence actuelle de ces gènes, l'impact qu'a eu le paludisme sur ces populations en terme de mortalité (30). Quoiqu'il en soit, ces polymorphismes génétiques ne peuvent à eux seuls rendre compte de la variabilité de réponse à l'infection palustre et des arguments existent aujourd'hui pour suspecter d'autres mécanismes de contrôle de la réponse à l'infection.

L'enquête réalisée en Gambie a étudié l'association entre des antigènes HLA et une expression clinique de la maladie (31). Cette étude de type cas/témoins comparait la fréquence de certains antigènes HLA de classe I et de classe II de 619 enfants atteints de paludisme sévère à différents groupes témoins : 510 enfants atteints d'un syndrome infectieux léger sans plasmodie dans le sang ; 354 enfants atteints d'un accès palustre simple ; 332 enfants hospitalisés pour un syndrome infectieux grave autre que le paludisme et 220 adultes sains. Deux stratégies différentes ont été utilisées pour le typage et l'analyse des résultats en fonction de la classe HLA considérée.

Pour les antigènes de classe I, une étude sérologique sur la moitié des sujets a testé l'association de 45 antigènes HLA. Parmi eux, l'antigène HLA-Bw53 a été retrouvé moins fréquemment chez les sujets atteints de paludisme sévère que dans l'ensemble des catégories témoins. Afin de confirmer la réalité de l'association et d'écarter une fausse association due au nombre important de tests effectués, cet antigène seul a été testé sur l'autre moitié de l'échantillon : cette nouvelle analyse a confirmé les résultats préalables. Plus précisément, l'antigène de classe I était présent dans 14.7% des cas d'anémies sévères et 16.1% des cas de neuropaludisme, contre 25% dans les différents groupes témoins. Globalement, le risque relatif de développer un accès sévère pour les individus porteurs de l'antigène HLA-Bw53 est de 0.59 (intervalle de confiance à 95% [IC95] = 0.43 - 0.81).

L'étude des antigènes HLA de classe II a révélé qu'un haplotype particulier était moins fréquent chez les

cas présentant une anémie sévère (8.7%) que chez les témoins atteints d'accès modéré (16.4%). Le risque relatif associé à cet haplotype était de 0.49, (IC95 = 0.33 - 0.72). Cet haplotype était également plus souvent associé aux cas de neuropaludisme, mais de manière non significative.

Les processus physiologiques à l'origine de cette protection semblent être similaires. L'absence de l'antigène de classe I à la surface des globules rouges permettait de penser que le mécanisme de résistance se situait à un stade précoce, pré-erythrocytaire, du cycle du parasite. Il a été montré que le mécanisme est la présentation d'un antigène spécifique du stade sporozoïte aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, spécifiques de la molécule de classe I HLA-Bw53 (20). Le mécanisme sous-jacent à la seconde association est probablement similaire, mettant en jeu l'aptitude qu'ont les sujets porteurs de l'haplotype à présenter aux lymphocytes T un épitope particulier d'un stade sanguin du parasite (31).

A partir des mêmes individus, les auteurs ont recherché une association entre le contrôle de la sécrétion d'une cytokine, le TNF α , impliquée dans les processus de cyto-adhérence durant les accès pernicieux et la survenue des accès de neuropaludisme (32). Pour cela, ils se sont intéressés à l'association entre l'allèle TNF2 du gène contrôlant cette sécrétion, et les accès de neuropaludisme. L'association s'est révélée significative uniquement chez les sujets homozygotes, puisque 4,5% des cas sont homozygotes pour cet allèle, contre 1,2% des témoins. Lorsque l'on s'intéresse au sous-groupe de cas décédés au cours de l'accès ou souffrant de séquelles neurologiques graves, cette association est encore retrouvée. Aucune association n'est par contre mise en évidence entre ce gène et les sujets présentant une anémie sévère. Il faut néanmoins noter que ces résultats ont été obtenus sur un nombre très faible de sujets (17 sujets homozygotes parmi 367 cas et 4 témoins sur 325).

* Les études familiales sans marqueur

Ce type d'études est principalement représenté par une méthode statistique étudiant les distributions familiales d'un phénotype, appelée analyse de ségrégation. L'analyse de ségrégation vise à détecter l'existence et à préciser la nature de(s) facteur(s) génétique(s) susceptible(s) d'expliquer les distributions familiales observées d'un caractère donné, en particulier une maladie. Classiquement, cette analyse permet de tester une ségrégation mendélienne simple dans les fratries. Dans de nombreux cas cependant, les distributions familiales du caractère ne peuvent s'expliquer par les lois d'une hérédité simple monogénique, autosomique ou liée au sexe, récessive ou dominante. En conséquence, vers 1970 ont été mis au point des modèles plus complexes, permettant de tenir compte des différents facteurs, génétiques ou environnementaux, intervenant dans le déterminisme des maladies. Parmi ceux-ci, une nouvelle approche basée sur des modèles régressifs permet de prendre en compte simultanément des facteurs de risque environnementaux et génétiques inclus dans le même modèle. Cette approche a été proposée dans un premier temps pour l'analyse d'un trait quantitatif (33), puis pour celle des phénotypes binaires en utilisant alors la régression logistique (34). La description de ces modèles, la comparaison des différentes approches et la stratégie des tests utilisée sortent du cadre de cette présentation. Ce type d'analyse a déjà donné des résultats intéressants

dans le domaine des maladies infectieuses chroniques, qu'elles soient parasitaires comme la schistosomose (35) ou la filariose de Bancroft (36), ou bactérienne comme la lèpre (37).

A notre connaissance, une seule analyse de ségrégation sur le paludisme a été réalisée (38). Cette enquête a été menée entre janvier 1988 et juillet 1990 au Sud-Cameroun, dans la ville d'Edéa où le paludisme est endémique avec une transmission modérée et de type urbain et s'est intéressée à un phénotype biologique, la densité parasitaire. La population de l'étude, non homogène sur le plan ethnique, présentait la particularité d'être très bien suivie sur le plan médical par le service de médecine du travail de l'entreprise qui les employait. Chaque individu a été prélevé plusieurs fois durant l'étude (2 à 10 fois), et la parasitémie a été déterminée par lecture des gouttes épaisses après coloration au Giemsa. Afin de tenir compte de la variabilité de la transmission dans le temps, chaque parasitémie a été ajustée sur la saison de prélèvement, en soustrayant de chaque densité parasitaire individuelle la densité parasitaire moyenne de la période de prélèvement. Une densité parasitaire ajustée a ainsi été calculée pour les sujets prélevés au moins deux fois et une moyenne de densité parasitaire ajustée a été effectuée pour chacun de ces sujets. Les facteurs de risques individuels et environnementaux susceptibles d'influer sur la densité parasitaire ont été relevés (âge, sexe, prise de prophylaxie, lieu de résidence) et analysés par les méthodes statistiques habituelles. Parmi eux, seuls le lieu de résidence et l'âge se sont révélés significativement liés à la parasitémie. Après ajustement sur ces facteurs, une analyse de ségrégation a été réalisée sur la densité parasitaire moyenne ajustée et s'est révélée compatible avec l'existence d'un gène majeur récessif prédisposant à de fortes parasitémies. La fréquence allélique estimée par le modèle était d'environ 45%, indiquant que près de 21% de la population était prédisposée à ces fortes infections.

L'importance de ce résultat nous a conduit à effectuer une nouvelle enquête de ségrégation sur une population différente vivant dans une zone de plus forte transmission. Cette analyse récemment réalisée dans le Sud-Cameroun confirme les résultats de la précédente enquête. Plus précisément, après ajustement sur la saison de prélèvement et sur l'âge des sujets, les premiers résultats sont compatibles avec l'existence d'un gène majeur co-dominant, contrôlant les niveaux de parasitémie, et avec la transmission mendélienne de ce gène. La fréquence de l'allèle délétère estimée par le modèle était de 24%, ce qui signifie qu'environ 6% de la population serait prédisposée à de fortes parasitémies (39). Cette étude devrait se poursuivre par une analyse de liaison génétique (*linkage*) qui étudie la transmission conjointe du phénotype étudié et d'un marqueur génétique dans les familles. Seule une analyse de ce genre, utilisant des informations familiales et un marqueur génétique, permet de confirmer et de localiser le gène contrôlant le phénotype étudié. Diverses méthodes sont utilisées dans les analyses de liaison génétique. Une première méthode, dite des *lod-scores*, utilise les paramètres génétiques fournis par l'analyse de ségrégation (fréquence allélique, pénétrances) et les mêmes modèles que ceux utilisés en analyse de ségrégation. Lorsque les paramètres génétiques ne sont pas connus, d'autres méthodes non paramétriques sont utilisées, en particulier la méthode dite des paires de germains.

CONCLUSION

Les études d'épidémiologie génétique dans le paludisme pourraient avoir des retombées intéressantes dans plusieurs domaines. Elles contribueront certainement à l'amélioration de nos connaissances dans les inter-relations hôte/parasite. En particulier, elles devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques et immunologiques intervenant dans cette pathologie complexe. Ces analyses pourraient également souligner l'intérêt de prendre en compte l'existence d'une variabilité génétique (identification de sujets à risque) dans le développement et l'évaluation des programmes de contrôle de la maladie. L'utilisation de phénotypes particuliers (répondeur/non répondeur à une protéine vaccinale) pourraient aider à comprendre les difficultés rencontrées dans l'élaboration de nouvelles molécules et de nouvelles stratégies vaccinales. Enfin, la recherche de l'effet biologique de(s) gène(s) identifié(s) par ces méthodes pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques. Bien évidemment, nous sommes conscients que de tels objectifs demanderont encore de nombreuses années de recherche. Cependant, les progrès spectaculaires de la biologie moléculaire au cours de ces dernières années permettent de penser que l'atteinte de ces objectifs n'est plus utopique.

REFERENCES

- 1 - RUMYANTSEV S.N. - Observations on constitutional resistance to infection. *Immunol.Today* 1992 ; 13 : 184-187.
- 2 - WAKELIN D., BLACKWELL J.M. - Genetics of resistance to bacterial and parasitic infection. Taylor and Francis Ltd Ed., Londres, 1988.
- 3 - STEVENSON M.M., LEMIEUX S., SKAMENE E. - Genetic control of resistance to murine malaria. *J. Cell. Biochem.* 1984 ; 24 : 91-102.
- 4 - SAYLES P.C., WASSOM D.L. - Immunoregulation in murine malaria : susceptibility of inbred mice to infection with *Plasmodium yoelii* depends on the dynamic interplay of host and parasite genes. *J. Immunol.* 1988 ; 141 : 241-248.
- 5 - STEVENSON M.M., LYANGA J.J., SKAMENE E. - Murine malaria : genetic control of resistance to *Plasmodium chabaudi*. *Infect. Immun.* 1982 ; 38 : 80-88.
- 6 - STEVENSON M.M., SKAMENE E. - Murine malaria : resistance of AXB/BXA recombinant inbred mice to *Plasmodium chabaudi*. *Infect. Immun.* 1985 ; 47 : 452-456.
- 7 - HOFFMANN E., WEIDANZ W.P., LONG C.A. - Susceptibility of CBX recombinant inbred mice to Murine malaria. *Infect. Immun.* 1984 ; 43 : 981-985.
- 8 - WUNDERLICH F., MOSSMANN H., HELWIG M., SCHILLINGER G. - Resistance to *Plasmodium chabaudi* in B10 Mice : influence of the H-2 complex and testosterone. *Infect. Immun.* 1988 ; 56 : 2400-2406.
- 9 - RILEY E.M., OLERUP O., TROYE-BLOMBERG M. - The immune recognition of malaria antigens. *Parasitol.Today* 1991 ; 7 : 5-11.
- 10 - SPITALNY G.L., NUSSENZWEIG R.S. - *Plasmodium berghei* : relationship between protective immunity and anti-sporozoite (CSP) antibody in mice. *Exp. Parasitol.* 1973 ; 33 : 168-180.
- 11 - DEL GIUDICE G., COOPER J.A., MERINO J., VERDINI A.S., PESSI A., TOGNA A.R., ENGBERS H.D., CORRADIN G., LAMBERT P.H. - The antibody response in mice to carrier-free synthetic polymers of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite repetitive epitope is I-A^b restricted : possible implications for malarial vaccines. *J. Immunol.* 1986 ; 137 : 2952-2965.
- 12 - GOOD M.F., BERZOFKY A., MALOY W.L., HAYASHI Y., FUJII N., HOCKMEYER W.T., MILLER L. H. - Genetic control of the immune response in mice to a *Plasmodium falciparum* sporozoite

- vaccine. Widespread nonresponsiveness to single malaria T epitope in highly repetitive vaccine. *J. Exp. Med.* 1986 ; **164** : 655-672.
- 13 - WEISS W.R., GOOD M.F., HOLLINGDALE M.R., MILLER L.H., BERZOFKY J.A. - Genetic control of immunity to *Plasmodium yoelii* sporozoites. *J. Immunol.* 1989 ; **143** : 4263-4266.
- 14 - HOFFMAN S.L., BERZOFKY J.A., ISENBARGER D., ZELTSER E., MAJARIAN W.R., GROSS M., RIPLEY BALLOU - Immune response gene regulation of immunity to *Plasmodium berghei* sporozoites and circumsporozoite protein vaccines. *J. Immunol.* 1989 ; **142** : 3581-3584.
- 15 - GOOD M.F., POMBO D., LUNDE M.N., LEE MALOY W., HALENBECK R., KOTH S.K., MILLER L.H., BERZOFKY J.A. - Recombinant human IL-2 overcomes genetic nonresponsiveness to malaria sporozoite peptides. *J. Immunol.* 1988 ; **141** : 972-977.
- 16 - CHANG S.P., NIKAIKO C.M., HASHIMOTO A.C., HSHIRO C.Q., YOKOTA B.T., HUI G.S.N. - Regulation of antibody specificity to *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein-1 by adjuvant and MHC haplotype. *J. Immunol.* 1994 ; **152** : 3483-3490.
- 17 - KHOURY M.J., BEATY T.H. - Application of the case-control method in genetic epidemiology. *Epidemiol. Rev.* 1994 ; **16** : 134-150.
- 18 - SCHAID D.J., SOMMER S.S. - Comparison of statistics for candidate-gene association studies using cases and parents. *Am. J. Hum. Genet.* 1994 ; **55** : 402-409.
- 19 - ALLISON A.C. - Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection. *Br. Med. J.* 1954 ; **1** : 290-294.
- 20 - HILL A.V.S., ELVIN J., WILLIS A.C., AIDOO M., ALLSOPP C.E.M., GOTCH F.M., GAO X.M., TAKIGUCHI M., GREENWOOD B.M., TOWNSEND A.R.M., McMICHAEL A.J., WHITTLE H.C. - Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992 ; **360** : 434-439.
- 21 - NAGEL R.L., ROTH E.F. - Malaria and red cell genetic defects. *Blood* 1989 ; **4** : 1213-1221.
- 22 - FRIEDMAN M.J., ROTH E.F., NAGEL R.L., TRAGER W. - The role of hemoglobins C, S and N^{Baltimore} in the inhibition of malaria parasite development *in vitro*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1979 ; **28** : 777-792.
- 23 - VERNES A.J.M., HAYNES J.D., TANG D.B., DUTOIT E., DIGGS C.L. - Decreased growth of *Plasmodium falciparum* in red cells containing haemoglobin E, a role for oxidative stress, and a sero-epidemiological correlation. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.* 1986 ; **80** : 642-655.
- 24 - FLINT J., HILL A.V.S., BOWDEN D.K., OPPENHEIMER S.J., SILL P.R., SERJEANTSON S.W., BANA-KOIRI J., BHATIA K., ALPERS M.P., BOYCE A.J., WEATHERALL D.J., CLEGG J.B. - High frequencies of a thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature*. 1986 ; **321** : 744-749.
- 25 - MODIANO G., MORPURGO G., TERRENATO L., NOVELLETTO A., DI RIENZO A., COLOMBO B., PURPURA M., MARIANI M., SANTACHIARA-BENERECETTI S., BREGA A., DIXIT K.A., SHRESTHA S.L., LANIA A., WANACHIWANAWIN W., LUZZATTO L. - Protection against malaria morbidity : near-fixation of the α -thalassaemia gene in a Nepalese population. *Am. J. Hum. Genet.* 1991 ; **48** : 390-397.
- 26 - LUZZI G.A., MERRY A.H., NEWBOLD C.I., MARSH K., PASVOLD G. - Protection by α -thalassaemia against *Plasmodium falciparum* malaria : modified surface expression rather than impaired growth or cytoadherence. *Immunol. Letters* 1991 ; **30** : 233-240.
- 27 - HILL A.V.S. - Malaria resistance genes : a natural selection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992 ; **86** : 225-226.
- 28 - LIU S.C., ZHAI S., PALEK J., GOLAN D.E., AMATO D., HASSANK., NURSE G.T., BABONA D., COETZER T., JAROLIM P., ZAIK M. BORWEIN S. - Molecular defect of the band 3 protein in Southeast Asian ovalocytosis. *New Eng. J. Med.* 1991 ; **323** : 1530-1538.
- 29 - WEATHERALL D.J. - Common genetic disorders of the red cell and the « malaria hypothesis ». *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1987 ; **81** : 539-548.
- 30 - MILLER H.L. - Impact of malaria on genetic polymorphisms and genetic diseases in African Americans. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1994 ; **91** : 2415-2419.
- 31 - HILL A.V.S., ALLSOPP C.E.M., KWIATKOWSKI D., ANSTEY N.M., TWUMASI P., ROWE P.A., BENNETT S., BREWSTER D., McMICHAEL A.J., GREENWOOD B.M. - Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 1991 ; **352** : 595-600.
- 32 - McGUIRE W., HILL A.V.S., ALLSOPP C.E.M., GREENWOOD B.M., KWJATKOWSKI D. - Variation of TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994 ; **371** : 508-511.
- 33 - BONNEY G.E. - On the statistical determination of major gene mechanisms in continuous human traits : regressive models. *Am. J. Med. Genet.* 1984 ; **18** : 731-749.
- 34 - BONNEY G.E. - Regressive logistic model for familial disease and other binary traits. *Biometrics* 1986 ; **42** : 611-625.
- 35 - ABEL L., DEMENAI S.F., PRATA A., SOUZA A.E., DESSEIN A. - Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Hum. Genet.* 1991 ; **48** : 959-970.
- 36 - OTTESEN E.A., MENDELL N.R., MacQUEEN J.M., WELLER P.F., AMOS D.B., WARD F.E. - Familial predisposition to filarial infection - not linked to HLA-A or -B locus specificities. *Acta Tropica* 1981 ; **38** : 205-216.
- 37 - ABEL L., DEMENAI S.F. - Detection of a major gene for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean Island. *Am. J. Hum. Genet.* 1988 ; **42** : 256-266.
- 38 - ABEL L., COT M., MULDER L., CARNEVALE P., FEINGOLD J. - Segregation analysis detects a major gene controlling blood infection levels of human malaria. *Am. J. Hum. Genet.* 1992 ; **50** : 1308-1317.
- 39 - GARCIA A., ABEL L., CHIPPAUX J.P., COT M., FEINGOLD J. - Segregation analysis of blood infection levels in malaria. Abstracts from the 3rd Annual Meeting of the International Genetic Epidemiology Society, Paris, France, June 1-2. *Genet. Epidemiol.* 1994 ; **11** : 293.