

# L'emploi de sondes d'ADN pour le diagnostic du paludisme: Mémoire d'une Réunion de l'OMS\*

*Les progrès récents accomplis dans la mise au point et l'application des sondes d'ADN pour le diagnostic du paludisme ont été examinés lors d'une consultation informelle de l'OMS, qui s'est tenue à Genève en octobre 1985. Ces sondes sont basées sur le principe que tout organisme possède des séquences uniques d'ADN, qui le différencient d'autres organismes étroitement apparentés. Plusieurs laboratoires ont réussi à isoler des sondes d'ADN spécifiques de Plasmodium falciparum. Leur caractéristique principale est qu'elles sont fortement répétées dans le génome de P. falciparum. En laboratoire leur sensibilité va de 5-10 pg à 1 ng d'ADN, ce qui correspond à  $10^2$ - $10^4$  plasmodies au stade annulaire par échantillon, et semble tout à fait comparable à celle d'un diagnostic microscopique classique. Cette technique présente donc apparemment un grand intérêt opérationnel. Un test basé sur l'emploi du génome entier de P. falciparum a également été mis au point, et des études ont été récemment entreprises sur l'application diagnostique de sondes d'ARN et d'ADN spécifiques des hématozoaires humains du paludisme.*

*L'évaluation sur le terrain, pour limitée qu'elle soit, montre que ces sondes ont une sensibilité tout à fait comparable à celle de la microscopie traditionnelle. Toutefois, la nécessité d'utiliser un traceur radioactif, le  $^{32}\text{P}$ , rend l'épreuve inutilisable si l'on ne dispose pas d'un laboratoire bien équipé. On s'efforce donc de simplifier l'épreuve et de mettre au point des méthodes non radioactives de marquage des sondes. Le présent article examine quelle serait l'application de ces techniques pour le diagnostic du paludisme dans le cadre des soins de santé primaires.*

## INTRODUCTION

Depuis la découverte des plasmodies par Laveran en 1881, le microscope a joué un rôle primordial dans le diagnostic du paludisme, surtout dans les cas où l'identification de l'espèce en cause et où l'estimation de la densité parasitaire constituent des critères importants pour le choix du traitement à appliquer. L'apparition et l'extension de souches de *P. falciparum* chloroquino- ou polypharmacorésistantes ont renforcé l'importance du diagnostic microscopique, puisque les médicaments de remplacement sont onéreux et que leur emploi à titre présomptif est à la fois inapproprié et coûteux.

La pratique générale actuelle qui consiste à appliquer aux cas de paludisme un traitement présomptif au niveau périphérique du système de soins de santé primaires, puis à examiner les frottis sanguins au niveau du district, ou à un niveau plus élevé, avant d'instaurer un traitement curatif,

entraîne un gaspillage de médicaments, le risque de provoquer une pharmacorésistance et, ce qui est probablement plus grave, un retard dangereux pour la vie des malades de l'application du traitement curatif. En dehors de son utilisation clinique, le diagnostic microscopique du paludisme joue également un rôle important dans les études épidémiologiques. Il est devenu l'outil indispensable de l'étude de la dynamique de cette maladie et de l'évaluation des mesures de lutte antipaludique.

Dans le paludisme, la microscopie est une épreuve diagnostique qui présente de nombreux avantages. Elle est sensible (par exemple, un bon observateur peut déceler une cellule parasitée sur  $1 \times 10^6$  hématies), et spécifique d'espèce et de stade. Elle peut également fournir des informations sur la viabilité de n'importe quel parasite présent dans le sang périphérique, connaissance qui peut s'avérer utile lorsqu'on évalue la réponse au traitement. L'examen de frottis sanguins devient quantitatif si l'on compte le nombre de champs qui, à fort grossissement, contiennent un ou plusieurs parasites, ou si l'on détermine le rapport de ces derniers aux leucocytes dans une goutte épaisse. La quantification devient très précise, si l'on associe l'examen microscopique de frottis sanguins et une numération érythrocytaire.

Les inconvénients de la microscopie sont qu'elle

\* Le présent Mémoire est basé sur le rapport d'une consultation informelle de l'OMS, qui s'est tenue à Genève du 2 au 4 octobre 1985. Les noms des participants figurent à la page 38. Les demandes de tirés à part peuvent être adressées à Recherche et Renseignements Techniques, Programme d'Action antipaludique, Organisation mondiale de la Santé, 1211 Genève 27, Suisse. L'original anglais de cet article a été publié dans le *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, 64 (5): 641-652 (1986).

nécessite un technicien qualifié et un microscope à fort grossissement bien entretenu, conditions qui font souvent défaut au niveau périphérique des soins de santé primaires. C'est également une méthode lente, puisque l'examen de routine d'une goutte épaisse prend au moins 5 à 10 minutes, si l'on veut déceler de faibles parasitémies de façon fiable.

Dans les régions impaludées, les soins de santé primaires requièrent des épreuves de diagnostic simples, rapides et sûres, pouvant être utilisées à tous les niveaux du système, en particulier sur le terrain lorsque le malade se trouve au poste sanitaire. Bien qu'on doive pouvoir poser un diagnostic microscopique dans ces conditions, cela se révèle impossible dans la plupart des régions impaludées du monde, notamment en Afrique tropicale. Il faut donc trouver d'autres méthodes. Les techniques basées sur la détection d'antigènes ou les sondes d'acide désoxyribonucléique (ADN) pourraient constituer des approches intéressantes.

Le présent Mémemorandum examine à quel stade en est la mise au point des sondes d'ADN et quelle serait leur application dans le diagnostic du paludisme. On trouvera des détails sur les autres méthodes possibles dans le rapport d'un groupe scientifique de l'OMS sur la biologie des parasites du paludisme (11).

#### DIAGNOSTIC DU PALUDISME DANS LE CADRE DES SOINS DE SANTÉ PRIMAIRES

Des moyens permettant le diagnostic sont nécessaires à trois niveaux des soins de santé primaires:

- laboratoires centraux bien équipés;
- laboratoires périphériques de référence;
- installations de terrain adaptées aux soins de santé primaires.

Le passage d'une stratégie antipaludique d'éradication à une stratégie de lutte et de développement d'activités de lutte intégrées aux systèmes nationaux de soins de santé primaires, ont fait que désormais on met l'accent sur le paludisme en tant que maladie. L'aspect curatif est donc devenu fondamental pour la lutte antipaludique, tout comme la lutte antivectorielle l'avait été pour l'éradication. Compte tenu des problèmes de pharmacorésistance du paludisme à falciparum, de la situation économique difficile des pays touchés et des chances limitées que l'on a de mettre au point de nouveaux antipaludiques, il faut faire un usage rationnel des médicaments disponibles, et chaque malade devra recevoir un traitement efficace. Cela n'est possible que si l'on dispose des moyens permettant de faire aisément le diagnostic, d'évaluer la réponse au traitement, de suivre chaque cas et de contrôler la qualité du diagnostic microscopique de routine.

L'équipement en microscopes nécessaire au diagnostic individuel des cas existe dans les laboratoires centraux, et, en général, dans les laboratoires périphériques, mais rarement sur le terrain. En principe, le matériel des laboratoires centraux sert également aux études épidémiologiques nécessaires aux opérations de lutte antipaludique comme les enquêtes, la surveillance des foyers de paludisme et celle de la situation de la maladie. Toutefois, ces études impliquent l'examen d'un très grand nombre de prélèvements de sang, ce qui prend un temps considérable et pose des problèmes logistiques importants. Des méthodes diagnostiques automatisées auraient par conséquent un impact capital sur les opérations de lutte antipaludique à ce niveau.

Dans la mesure où les tests diagnostiques ont des fonctions différentes, ils devront avoir une spécificité et une sensibilité qui répondent à l'objectif de l'étude et/ou au niveau auquel ils seront employés. Par exemple, alors qu'un test destiné au diagnostic individuel des cas dans des régions à immunité collective relativement faible devra être très sensible, cela importera peu dans les régions à transmission intensive du paludisme, comme l'Afrique tropicale. Dans ces régions, où la majeure partie de la population peut présenter une faible parasitémie sans souffrir de la maladie, il sera plus approprié de disposer de tests ayant une sensibilité critique de 1000 à 10 000 plasmodies asexuées par microlitre de sang. Un tel test, semi-quantitatif, donnant une indication grossière du degré de parasitémie constituerait en fait un avantage. Le tableau 1 résume les caractéristiques requises des tests diagnostiques du paludisme, dans les deux types de situation, clinique et épidémiologique.

#### TECHNOLOGIE DE BASE DE L'UTILISATION DIAGNOSTIQUE DE SONDES D'ADN

##### *Principes généraux des sondes d'ADN*

La mise au point et l'emploi des sondes d'ADN pour le diagnostic du paludisme sont basés sur le principe selon lequel tout organisme possède des séquences d'ADN uniques, qui le différencient des autres organismes étroitement apparentés; cela suppose que ces séquences soient identifiées et isolées. On y parvient, en général, en employant des techniques de recombinaison de l'ADN (ADNr), pour identifier à la fois les sondes potentielles et les séquences cibles, ce qui permet ensuite de produire des sondes d'ADN à usage diagnostique. Ces séquences cibles d'ADN peuvent être constituées d'éléments fortement répétés du génome parasitaire ou de gènes connus pour coder pour une molécule particulière, par exemple les gènes codant pour

Tableau 1. Valeur relative, pour la clinique et l'épidémiologie, des diverses caractéristiques des tests diagnostiques du paludisme

Caractéristique	Diagnostic clinique	Etudes épidémiologiques
Sensibilité	Population immune + + Population non-immune - + + +	+ + + + "
Spécificité d'espèce	+ + + -	- + + + "
Quantification de la densité parasitaire		
Forte parasitémie	Population immune + + + Population non-immune +	+
Faible parasitémie	Population immune - Population non-immune + + +	+ + +
Résultats immédiats	+ + + +	+
Possibilité d'analyser un grand nombre d'échantillons	+ +	+ + + + "
Spécificité de stade	±	+ + + +
Emploi d'un isotope radioactif dans l'épreuve	Non acceptable	Acceptable

" Il existe des techniques avec sondes d'ADN

l'acide ribonucléique ribosomique. A l'avenir, on pourra peut-être mettre au point des sondes d'ADN capables de faire la distinction entre plasmodies pharmacorésistants et pharmacosensibles.

Une fois la sonde d'ADN identifiée et isolée, elle peut être employée pour le diagnostic. La réaction sur laquelle repose ce test diagnostique est la dénaturation et la renaturation des brins d'ADN complémentaire. Dans toute sonde d'ADN ou séquence cible, les bases nucléotidiques sont disposées dans un ordre précis. L'ADN dénaturé ne peut se renaturer que si les bases sont dans le même ordre. Ainsi, deux chaînes d'ADN, celle de la séquence cible et celle complémentaire de la sonde, doivent avoir une séquence identique pour pouvoir se renaturer ou s'hybrider (fig. 1). La sonde d'ADN ne s'hybridera pas avec d'autres séquences d'ADN dont les nucléotides ne sont pas disposés dans le même ordre. C'est ce principe qui confère à ces épreuves leur spécificité.

#### *Production d'une sonde marquée: méthodes de marquage*

Pour pouvoir détecter la réaction d'hybridation, il faut marquer la sonde de manière à la visualiser. A l'heure actuelle, la méthode la plus courante consiste à employer un isotope radioactif révélé par une plaque photographique. D'autres méthodes de détection, comme le marquage à la biotine, sont en cours d'étude. Les trois méthodes suivantes sont possibles.

*a) Marquage direct des séquences d'ADN.* Pour obtenir une sonde marquée, on coupe d'abord artificiellement le fragment d'ADN à l'aide d'enzymes appropriées, puis on ajoute de l'ADN-polymérase I et des désoxyribonucléotides triphosphates qui l'enzyme polymérise en une nouvelle chaîne. Si l'un des triphosphates est marqué, par exemple au  $^{32}\text{P}$  ou à la biotine, on obtient une sonde avec traceur repérable. Cette méthode est appelée coupure-substitution.

Les avantages de cette méthode, associée à l'isolement de la sonde d'ADN dans un plasmide approprié, sont qu'elle est d'exécution facile, qu'elle amplifie le signal du traceur et qu'elle peut être utilisée pour un marquage radioactif ou à la biotine. Ses inconvénients sont que des hybridations non spécifiques peuvent se produire en raison de la présence de séquences du plasmide et qu'il peut y avoir renaturation spontanée, ce qui réduit l'affinité de la sonde pour l'ADN cible.

Le bactériophage M13 peut également servir de vecteur pour la construction des sondes d'ADN. Ce phage est inhabituel puisque son ADN peut exister aussi à l'état monocaténaire. Il peut être marqué par synthèse partielle d'une seconde chaîne. Une autre possibilité serait de marquer la forme bicaténaire du M13 et de l'utiliser comme "sonde secondaire", ce qui éviterait d'avoir à marquer chaque sonde. L'avantage du M13 est qu'on peut obtenir une activité spécifique élevée avec un marquage au  $^{32}\text{P}$  et qu'il est également possible de le marquer à la

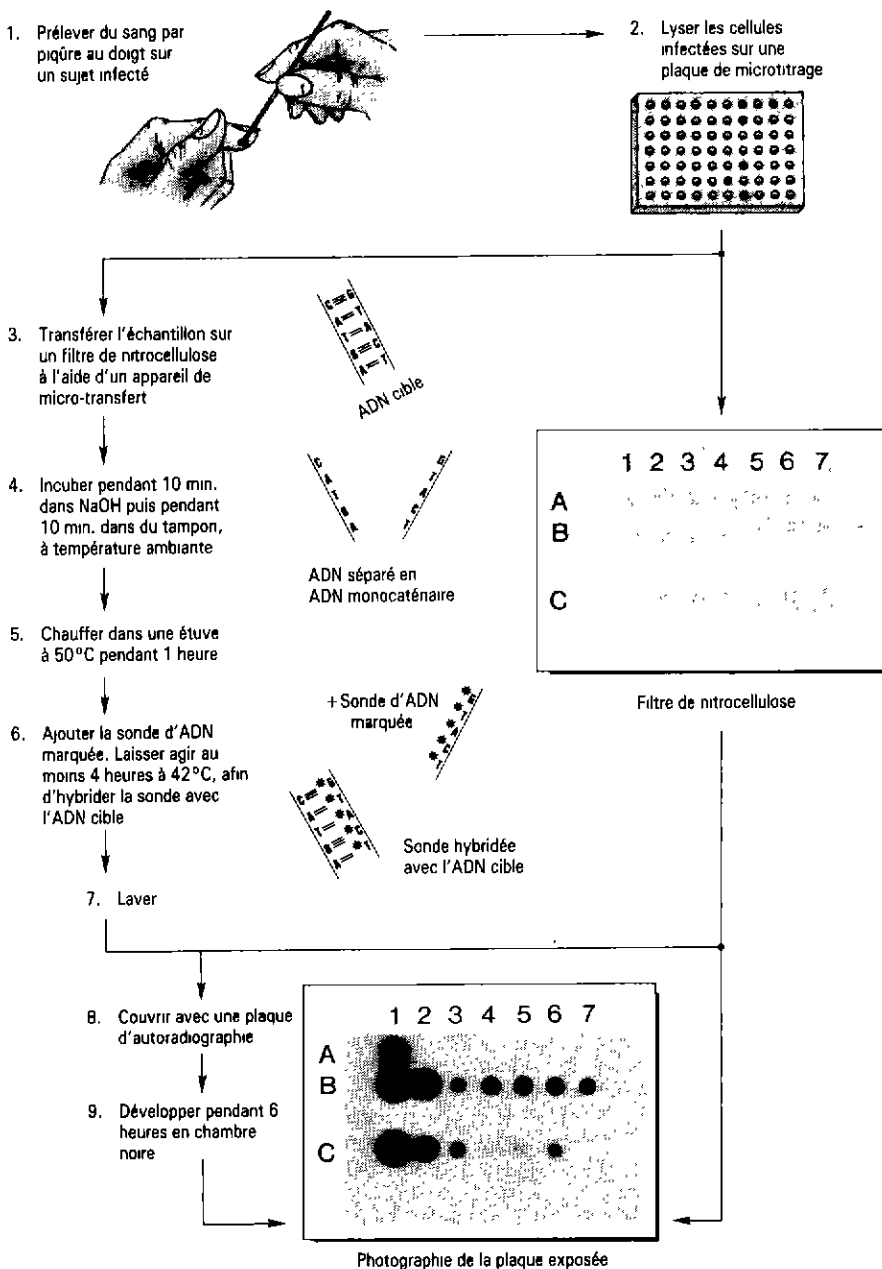


Fig. 1. Méthode utilisée pour l'hybridation sur filtre des sondes d'ADN avec l'ADN de *P. falciparum*.

biotine. Comme l'ADN du M13 est monocaténaire, la compétition entre la renaturation et l'hybridation avec l'ADN cible n'est plus un problème. Par contre, un inconvénient de cette technique est qu'une hybridation non spécifique avec l'ADN humain peut se produire, en raison de la présence de séquences du bactériophage.

*b) Copies ARN de séquences d'ADN clonées.* Des copies ARN de séquences d'ADN précises peuvent être obtenues grâce à l'ARN-polymérase, dont la fonction dans la nature est de copier les gènes pour les traduire en protéines. Le produit de l'ARN-polymérase est une copie ARN de l'ADN, qui contient toujours la séquence de bases de l'ADN et qui peut s'hybrider avec elle. On peut incorporer un traceur dans la copie ARN en utilisant des ribonucléotides triphosphates radioactifs.

Les tests basés sur cette approche sont également faciles à exécuter et le marquage de la sonde au  $^{32}\text{P}$  peut être réalisé avec une activité spécifique élevée, analogue à celle des sondes d'ADN produites dans le bactériophage M13. Elles sont également monocaténaires et évitent par conséquent toute compétition entre la renaturation et l'ADN cible. De plus, ces sondes ne contiennent pas de séquence plasmidique et, comme les hybrides ARN-ADN sont plus stables que les hybrides ADN-ADN, on peut effectuer la réaction d'hybridation dans des conditions plus restrictives, réduisant ainsi les signaux de fond non spécifiques.

Des études préliminaires de l'application des sondes d'ARN au diagnostic du paludisme ont été entreprises (6). On a obtenu une sonde marquée au  $^{32}\text{P}$  par transcription *in vitro*, à l'aide d'ARN-polymérase, du recombinant linéaire obtenu par clonage du fragment d'ADN Rep2 au site Hind III d'un plasmide vecteur pSP64. Comme on peut obtenir une activité spécifique plus élevée en prenant des sondes d'ARN radiomarquées, l'ARN SP6-RepHind s'est révélé plus sensible que la sonde d'ADN Rep2 pour détecter l'ADN de *P. falciparum*, des parasitemies de 0,0001% étant décelées dans 100  $\mu\text{l}$  d'un culot d'hématies infectées (c'est-à-dire environ 1000 *P. falciparum*). En outre, les faibles signaux de fond parfois observés avec les sondes d'ADN étaient inexistantes avec celle d'ARN.

*c) Autres méthodes possibles.* Bien qu'on ait surtout employé l'ADN comme molécule cible pour la mise au point de tests diagnostiques basés sur la technique d'hybridation, toute séquence unique du génome parasite pourrait servir de cible à une sonde d'hybridation. Toutefois, comme les séquences présentes dans une seule copie rendent l'épreuve peu sensible, il est souhaitable de choisir comme cible des séquences souvent répétées dans le génome.

On peut employer de l'ARN plutôt que de l'ADN parasite comme cible de l'hybridation, avec l'avantage que la transcription provoque une amplification de la séquence, un choix intéressant étant constitué par l'ARN ribosomique qui est présent à plus d'un million de copies par cellule; l'inconvénient est que les gènes d'ARN ribosomique sont les mêmes entre espèces apparentées, ce qui peut rendre le test moins spécifique. En outre, l'ARN est moins stable que l'ADN et l'épreuve nécessiterait une manipulation plus délicate que pour les tests utilisant l'ADN comme cible. Le marquage par des traceurs non radioactifs comme la biotine n'a pas jusqu'à présent très bien réussi. Il existe des gènes clonés de l'ADN de *P. falciparum* et il faudrait étudier la possibilité de les utiliser à des fins diagnostiques.

Un autre avantage de ces sondes pour les ARN cibles est qu'elles devraient permettre, du moins en théorie, de faire la distinction entre les divers stades parasitaires, puisque différentes séquences d'ARN sont probablement exprimées à chaque stade du cycle évolutif du parasite.

#### *Synthèse chimique*

Plutôt que d'utiliser des sondes d'ADN cloné issues de bactéries, on pourrait envisager la synthèse chimique des oligonucléotides. Cette approche suppose connue la séquence des bases de l'ADN cible. On peut produire en peu de temps de grandes quantités de ces sondes "sur mesure" par synthèse chimique d'oligonucléotides, basée sur la séquence de l'ADN de sondes spécifiques. Toutefois, à l'heure actuelle, le marquage au  $^{32}\text{P}$  donne une sonde d'une faible activité spécifique et le succès de l'hybridation dépend de l'appariement correct des séquences de bases de la sonde chimique avec celles de l'ADN cible. Cela peut poser un problème lorsqu'on a des séquences fortement répétées qui varient légèrement à chaque répétition.

#### *Prise de sang pour analyse*

Il faut disposer d'un volume de sang déterminé pour pouvoir comparer les prélèvements et faciliter la quantification de l'épreuve. Dans ce but, la méthode la plus commode consiste à prélever directement du sang, par piqûre au doigt, dans un tube capillaire de volume connu. Une autre méthode, moins satisfaisante, consiste à laisser le sang imprégner un papier filtre préalablement marqué d'une façon telle qu'un prélèvement couvrant une surface délimitée ait un volume approximativement déterminé.

Actuellement, les prélèvements de sang destinés à l'analyse par sondes d'ADN se font dans des tubes capillaires héparinés, après quoi le sang (100  $\mu\text{l}$  au plus) est versé dans un petit récipient. Cette méthode

est facile à appliquer, relativement bon marché, et praticable pour autant qu'on dispose des moyens de traiter les prélèvements; ceux-ci ne doivent toutefois pas être trop nombreux, ce qui pourrait poser des problèmes, ainsi d'ailleurs que leur transport sur de grandes distances vers un laboratoire central. Il faudrait mettre au point une méthode simplifiée, par exemple l'application directe du prélèvement sur du papier nitrocellulosique, bien qu'il faille là aussi résoudre le problème de la manipulation du papier sur le terrain. Desséchés, ces prélèvements pourraient être facilement conservés ou envoyés par la poste au laboratoire. Une variante de la collecte sur papier filtre serait la solution idéale.

MISE AU POINT DE SONDAS D'ADN  
POUR LE DIAGNOSTIC DU PALUDISME:  
SITUATION ACTUELLE

Pour mettre au point des techniques de diagnostic à base d'ADN, il est indispensable d'identifier, pour chaque espèce de plasmodies, des sondes spécifiques ayant un degré satisfaisant de sensibilité. Ces sondes doivent pouvoir reconnaître toutes les souches d'une espèce donnée et pas seulement celles dont elles sont issues. En outre, elles ne doivent pas réagir avec l'ADN humain ou l'ADN d'autres microorganismes susceptibles d'être présents dans les échantillons analysés.

Des sondes d'ADN qui pourraient remplacer, pour le diagnostic, l'examen d'étalements de sang auraient plusieurs avantages, sous réserve que les difficultés techniques que pose l'application sur le terrain d'un test basé sur ces principes soient surmontées. Son avantage le plus net et le plus immédiat est qu'il pourrait être automatisé, diminuant ainsi le temps nécessaire pour chaque diagnostic. Ce serait particulièrement utile dans les grandes enquêtes sur les populations impaludées, qui peuvent nécessiter l'examen de milliers de prélèvements. Au stade actuel de leur mise au point, les tests basés sur des sondes d'ADN ont une sensibilité et une spécificité qui ne le cèdent en rien à celles obtenues en microscopie optique. Toutefois, le fait d'avoir à employer une sonde d'ADN à traceur radioactif interdit son emploi diagnostique à tous les niveaux des soins de santé, sauf à celui du laboratoire central bien équipé. D'autres méthodes de marquage sont donc recherchées.

Des sondes d'ADN d'une spécificité prouvée à l'égard de *P. falciparum* ont été mises au point dans plusieurs laboratoires (2, 5, 7). Leur caractéristique principale est qu'elles sont fortement répétées dans le génome de *P. falciparum*. Leur sensibilité, qui va de 5-10 pg à 1 ng d'ADN, ce qui correspond à  $10^2$ - $10^4$  plasmodies au stade annulaire pour un seul prélève-

ment, paraît tout à fait comparable à celle obtenue en microscopie classique. Il semble donc que cette technique ait un intérêt opérationnel. Un test basé sur l'emploi du génome complet de *P. falciparum* a également été mis au point (8) et récemment, des études sur l'application des sondes d'ARN pour le diagnostic du paludisme ont été entreprises.

Si on leur appliquait des méthodes d'hybridation-transfert et d'analyse chromosomique, les sondes d'ADN seraient peut-être également capables de déceler des différences à l'intérieur d'une même espèce.

*Etudes en laboratoire*

Franzén et al. (5) ont isolé des clones contenant des séquences d'ADN fortement répétées dans une banque génomique obtenue à partir de l'isolement de *P. falciparum* F32 provenant de la République-Unie de Tanzanie. On a choisi l'un des clones, le Rep2, pour le caractériser par analyse de la séquence des nucléotides. Les résultats ont montré que le fragment inséré de ce clone était composé de répétitions imparfaites de 21 paires de bases disposées en tandem. On a estimé que ces répétitions constituaient environ 1% du génome de *P. falciparum*, qui en comprend  $10^4$  à  $2 \times 10^5$  copies, selon l'estimation de la taille du génome utilisée pour le calcul. De plus, ces copies sont disposées en grappes et il ne semble pas qu'elles aient été transcrites dans des cultures de *P. falciparum* non synchrones (1). Cette sonde n'a pas présenté de réactions croisées avec les plasmodies humaines des espèces *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* ni avec les espèces *P. chabaudi* et *P. yoelii* trouvées chez les rongeurs; il n'y a pas eu non plus de réaction croisée avec les protozoaires *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* et *Entamoeba histolytica*. Cette sonde d'ADN, après coupure-substitution, était capable de déceler 25 pg d'ADN purifié de *P. falciparum* et des taux de parasitémie de 0,001%. On a obtenu ces résultats en marquant la sonde au  $^{32}\text{P}$  avec une activité spécifique modérée.

Barker et al. (2) ont effectué le criblage d'une banque génomique partielle de l'isolement gambien FCR-3 de *P. falciparum* et ils ont isolé au moins 30 séquences fortement répétées. Tous les fragments clonés s'hybridaient avec l'ADN de *P. falciparum* mais ne présentaient aucune réaction croisée avec l'ADN humain. La séquence la plus fortement répétée, le clone pPF14, a été choisie pour des études complémentaires et s'est révélée spécifique de *P. falciparum*, puisqu'elle n'a pas réagi avec des ADN purifiés de *P. vivax*, *P. cynomolgi*, *P. gallinaceum* ou *P. lophurae*, ni avec des cellules infectées par *P. malariae* ou *P. ovale*. Après coupure-substitution sur le pPF14, on a pu déceler 5 pg d'ADN purifié de *P. falciparum* et une très faible parasitémie

(200 plasmodies) dans les prélèvements de sang.

L'analyse quantitative a montré que le pPF14 était répété entre  $10^4$  et  $10^5$  fois par génome, selon la taille estimée de ce dernier. Il est présent dans tout le génome sous forme de grappes dispersées non identiques et semble exister sur tous les chromosomes. Il est formé d'une courte répétition qui possède une séquence centrale commune et une séquence latérale variable.

Un fragment d'ADN répétitif, le Rep20, provenant d'un isolement africain de *P. falciparum*, l'HG-13, a été cloné et analysé par Oquendo et al. (7). Comme les deux sondes précédentes, ce fragment contenait une séquence de 21 paires de bases se répétant de nombreuses fois en tandem. On a trouvé sur le même fragment d'ADN deux grappes de la même copie orientées à l'opposé l'une de l'autre. Les données actuelles laissent à penser que le Rep20 est spécifique d'espèce. Il a réagi avec de l'ADN des stades érythrocytaires d'isolements de *P. falciparum* provenant de Thaïlande et de Papouasie-Nouvelle-Guinée, ainsi qu'avec des hématies parasitées par divers clones génétiquement purs de *P. falciparum* provenant de Thaïlande. Il n'a pas réagi avec l'ADN purifié de *P. chabaudi* et de *P. berghei*, ni avec des cellules infectées par *P. vivax*.

Un autre fragment répété, le pBRK1-14, de l'ADN de l'isolement K1 de *P. falciparum* a été cloné et analysé (Sakol Panayim, communication personnelle, 1985). Il contenait un insert de 746 paires de bases et décelait des quantités d'ADN pur de *P. falciparum* de l'ordre du ng. Il ne présentait pas de réaction croisée avec l'ADN des plasmodies de *P. vivax*, *P. cynomolgi*, *P. knowlesi* et *P. chabaudi*, ni avec l'ADN humain ou l'ADN du moustique *Anopheles dirus*. La sonde pBRK1-14, en raison de sa sensibilité comparativement plus faible, pourrait être plus utile pour la détection spécifique de parasitemies à *P. falciparum* relativement élevées, bien que son aptitude à distinguer les divers isolements et clones doive être étudiée plus avant.

Cette sonde, tout comme l'ADN répétitif obtenu à partir des banques d'ADN des isolements Honduras I/CDC et FCR-3/Gambien de *P. falciparum* (3) et du clone E12 d'un isolement de Papouasie-Nouvelle-Guinée de *P. falciparum* (4), a été utilisée pour montrer les variations entre clones. L'arrangement de l'ADN répétitif des clones de l'isolement Honduras I/CDC s'est révélé instable puisqu'on a pu déceler des variations après six mois de culture *in vitro*.

La sonde pBRK1-14 a montré un mode d'hybridation-transfert différent avec l'isolement africain G112 de *P. falciparum* et les clones T9/94, T9/96, T9/98 et T9/106 de *P. falciparum* provenant de la province de Tak en Thaïlande. Ces clones diffèrent par leur pharmacosensibilité, leurs caractéristiques isoenzymatiques et leurs protéines de surface détec-

tées par les anticorps monoclonaux (9). Toutefois, la pBRK1-14 n'a pu faire la distinction entre les clones T9/96 et T9/98 qui n'avaient comme différence que leur sensibilité aux antipaludiques courants.

Pollak et al. (8) ont mis au point une épreuve rapide et simple de détection de *P. falciparum* dans le sang humain. Elle est basée sur l'hybridation ADN-ADN, avec comme sonde de l'ADN entier radiomarqué et comme sang, celui recueilli par piqûre au doigt. Ils ont signalé que cette technique permettait de déceler des taux de parasitémie de 0,0001% dans  $10 \mu\text{l}$  de sang.

Coppel et al. (4) ont utilisé trois sondes d'ADN complémentaire provenant de gènes d'antigènes clonés pour faire la distinction entre des isolements de *P. falciparum*. Deux des sondes codaient pour les antigènes S, ce qui laisse à penser que les variations décelées par ces sondes sont le reflet de modifications dans la masse moléculaire relative ( $M_r$ ) de ces protéines, alors que la troisième codait pour une protéine de  $M_r$  250 000. Il semblerait que les variations décelées par cette troisième sonde soient le reflet de modifications dans la taille du peptide et le nombre de ses répétitions.

Van der Ploeg et al. (10) ont décrit une autre technique basée sur l'analyse de l'ADN et susceptible de faire la distinction entre des isolements de *P. falciparum*. Cette méthode est fondée sur la séparation de molécules d'ADN de la taille d'un chromosome, d'une longueur d'au moins 2000 kilobases, par électrophorèse sur gel avec gradient de concentration et champ pulsé après lyse légère des hématies infectées. Cette technique a montré que les stades érythrocytaires asexués et sexués de la même lignée parasitaire possédaient des cariotypes identiques, tandis que la longueur de ces molécules d'ADN de taille chromosomique différait selon les isolements géographiques et selon les clones dérivés d'une même population de *P. falciparum*. Bien que cette technique puisse servir à faire la distinction en laboratoire entre populations parasitaires, elle ne semble pas avoir d'application sur le terrain.

#### Evaluation sur le terrain

Jusqu'ici, seules les sondes pPF14 et Rep2 de *P. falciparum* ont été soumises à une évaluation limitée sur le terrain. La première a été utilisée pour analyser 632 prélèvements de sang en Thaïlande et 570 au Kenya, et la seconde 28 prélèvements au Libéria.

La méthodologie de base employée en Thaïlande et au Kenya était la suivante: on a recueilli  $50 \mu\text{l}$  de sang dans un tube capillaire hépariné, après piqûre au doigt; ce sang a été lysé puis déposé sur un filtre de nitrocellulose à l'aide d'un système de micro-transfert par taches ("dot-blot"); l'ADN a été dénaturé

Tableau 2. Résultats préliminaires d'une étude comparative du diagnostic du paludisme (*Plasmodium falciparum*) par examen microscopique<sup>a</sup> et par sonde d'ADN (pPF14)

Etude thaïlandaise:	
Total des malades:	577
Total des positifs (Frottis + ADN +)	151
Faux négatifs (Frottis + ADN -)	36
Total des négatifs (Frottis - ADN -)	426
Faux positifs (Frottis - ADN +)	13
Etude kenyane:	
Total des malades	509
Total des positifs (Frottis + ADN +)	188
Faux négatifs (Frottis + ADN -)	37 <sup>b</sup>
Total des négatifs (Frottis - ADN -)	321
Faux positifs (Frottis - ADN +)	34 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Le diagnostic a été posé par un technicien en microscopie expérimenté qui a examiné 200 champs d'une goutte épaisse

<sup>b</sup> Par la suite, 19 d'entre eux se sont révélés négatifs après second examen de la goutte épaisse

<sup>c</sup> Par la suite, 11 d'entre eux se sont révélés réellement positifs après second examen de la goutte épaisse

*in situ* et fixé sur le filtre par chauffage; les filtres ont ensuite été hybridés avec la sonde d'ADN radioactive, lavés et exposés à un film sensible aux rayons X (fig. 1). Deux modifications ont été apportées à cette technique dans l'étude libérienne, à savoir que l'ADN a été d'abord extrait avec du phénol après lyse, puis dénaturé avant d'être déposé sur le filtre de nitrocellulose.

L'étude thaïlandaise a été effectuée dans la province de Chantaburi, sur la frontière orientale, selon un protocole permettant une comparaison détaillée entre l'examen microscopique de routine des étalements de sang, un examen microscopique plus complet et la technique avec sonde d'ADN. L'étude du Kenya, réalisée en coopération avec le Kenya Medical Council et les laboratoires Wellcome, a été faite suivant le même protocole. La méthodologie était la suivante:

a) Examen de routine de gouttes épaisses colorées des sujets consultant d'eux-mêmes le dispensaire anti-paludique soit pour de la fièvre actuelle ou récente, soit pour un examen de suivi après un diagnostic de paludisme. L'examen consistait en une recherche rapide des hématozoaires sur 50 à 100 champs microscopiques.

b) Examen plus détaillé, par un technicien expérimenté en paludologie, de 200 champs microscopiques d'une goutte épaisse colorée au Giemsa, et notation de l'espèce, du stade parasitaire et du

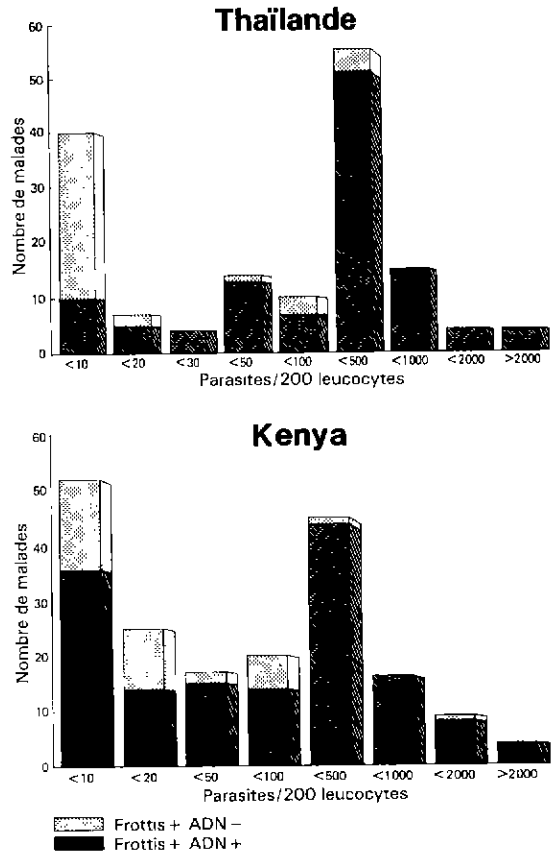


Fig. 2. Comparaison des résultats du diagnostic parasitologique et du test avec sonde d'ADN pour *P. falciparum* chez 577 malades thaïlandais et 509 malades kenyans, en fonction de la densité parasitaire.

nombre d'hématozoaires pour 200 leucocytes.

c) Recherche des parasites dans les prélèvements de sang à l'aide de la sonde d'ADN selon la méthode décrite plus haut, effectuée au laboratoire de terrain de Chantaburi et dans un laboratoire central bien équipé situé aux Etats-Unis d'Amérique.

Le tableau 2 et les figures 2 et 3 résument les résultats obtenus dans les études menées en Thaïlande et au Kenya. Il faut poursuivre l'analyse de ces données, en particulier dans les cas où les résultats sont contradictoires. Néanmoins, il est intéressant de noter que 71% des faux négatifs, c'est-à-dire les cas positifs à l'examen microscopique et négatifs par le test à la sonde d'ADN, ont été observés chez des malades ayant des parasitemies très faibles, de moins de 10 plasmodies pour 200 leucocytes, ce qui correspond à moins de 400 plasmodies par  $\mu$ l de sang.



Une évaluation sommaire de la sonde d'ADN Rep2 s'est faite sur des prélèvements de sang recueillis par piqûre au doigt chez 28 hommes asymptomatiques vivant dans une région d'holoendémie du Libéria.

Dix-sept d'entre eux se sont révélés positifs par le test à la sonde d'ADN, contre 21 après examen microscopique de 40 minutes d'une goutte épaisse colorée au Giemsa (6). Si chaque goutte épaisse n'avait été examinée que pendant 10 minutes, on n'aurait diagnostiqué que 15 sujets positifs. La densité parasitaire allait de 2 à 4500 *P. falciparum*/ $\mu$ l, avec une médiane de 20/ $\mu$ l. Six sujets présentaient des infections mixtes à *P. falciparum*/*P. malariae* et un malade une infection unique à *P. malariae*. Cette dernière n'a pas été décelée par le test à la sonde d'ADN. La détection limite sur le terrain était d'environ 10 *P. falciparum*/ $\mu$ l pour des échantillons de 35  $\mu$ l.

Sur les quatre prélèvements infectés par *P. falciparum* et qui n'ont pas réagi à l'épreuve d'hybridation, l'un avait 10 plasmodies asexuées et 30 gamétocytes par  $\mu$ l, le second 15 plasmodies asexuées par  $\mu$ l et les deux derniers 2 plasmodies asexuées par  $\mu$ l. Tous les prélèvements pour lesquels l'examen microscopique n'avait révélé aucune parasitémie à *P. falciparum* après 40 minutes étaient également négatifs par le test d'hybridation.

FUTURES ÉTUDES SUR LES SONDES À USAGE DIAGNOSTIQUE

Sondes d'ADN

On a identifié plusieurs clones d'ADN de *P. falciparum* contenant des séquences répétitives et capables de déceler les plasmodies dans le sang. Ils semblent être spécifiques d'espèce et reconnaître des isollements provenant de régions géographiques très diverses. On a également découvert des sondes décelant des variations entre clones.

La structure de deux fragments répétitifs clonés indépendamment a été mise en évidence et décrite en détail (1, 7). Tous deux consistent en répétitions imparfaites en tandem d'une séquence de 21 paires de bases. Ces clones, malgré leur origine différente (l'un provenait d'un hématozoaire de Tanzanie et l'autre de Gambie) ont des répétitions en tandem du même type. Bien que les autres clones soient moins bien caractérisés à l'heure actuelle, l'analyse de restriction et le séquençage de certains nucléotides semblent indiquer qu'ils ont tous une structure interne répétitive. Par conséquent, il semble absolument nécessaire de les comparer pour déterminer s'ils sont ou non identiques.

En pratique, l'intérêt des clones d'ADN répétitif pour le diagnostic dépend autant de leur sensibilité que de leur spécificité. Des tests de sensibilité différente seront nécessaires pour répondre à l'emploi qu'on en fera. On estime à l'heure actuelle que la limite théorique de sensibilité d'une sonde

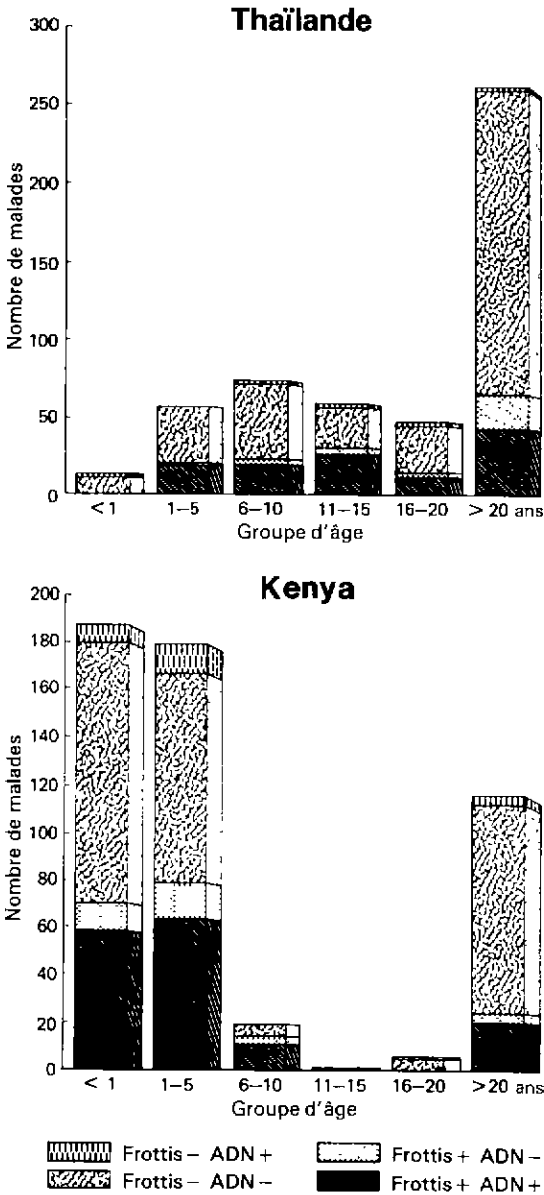


Fig 3 Comparaison des résultats du diagnostic parasitologique et du test avec sonde d'ADN pour *P. falciparum* chez 577 malades thaïlandais et 509 malades kenyans, en fonction de l'âge.

unique marquée au  $^{32}\text{P}$  ayant l'activité la plus élevée possible est de l'ordre de 100 à 1000 plasmodies/ 50  $\mu\text{l}$  de sang, soit 2 à 20 plasmodies/ $\mu\text{l}$ , ce qui représente une parasitémie de 0,00004 à 0,0004% (sur la base d'une numération érythrocytaire de  $5 \times 10^9/\text{ml}$  de sang). Toutefois, ces résultats supposent l'utilisation du  $^{32}\text{P}$ , un traceur à forte radioactivité. Bien que cette sensibilité soit tout à fait comparable à celle de la microscopie traditionnelle, il faut l'améliorer pour les cas où même les densités parasitaires les plus faibles doivent être décelées. Le niveau de détection des séquences de bases de l'ADN cible pourrait être élevé en associant des sondes différentes pour un même parasite, ou en utilisant quatre désoxyribonucléotides triphosphates marqués. Des techniques d'une sensibilité plus faible, avec un seuil de détection de 1000 parasites/ $\mu\text{l}$ , faciliteraient le diagnostic du paludisme clinique dans les zones de forte endémicité; ce serait possible avec les sondes dont on dispose à l'heure actuelle.

Jusqu'à présent, tous les efforts entrepris pour mettre au point des sondes destinées au diagnostic ont porté sur *P. falciparum*, bien que l'on commence aussi maintenant à constituer des banques génomiques pour *P. vivax*. Il semble probable que l'on parvienne à mettre au point des sondes pour cette espèce dans un proche avenir. Il n'existe pas de banque génomique pour les deux autres plasmodies humaines, *P. malariae* et *P. ovale*, et la mise au point de sondes pour le diagnostic d'un paludisme à *P. ovale* n'est pas actuellement très urgente. Par contre, des sondes capables d'identifier *P. malariae* auraient leur place dans le cadre de la lutte antipaludique en Afrique.

Il serait également intéressant du point de vue opérationnel de disposer d'une sonde universelle capable de reconnaître tous les types de paludisme sans précision de l'espèce. Une telle sonde aurait des applications au niveau des soins de santé primaires, lorsqu'on cherche à savoir si le paludisme est bien la cause de symptômes cliniques, des tests ultérieurs pouvant ensuite être effectués pour identifier l'espèce si le traitement du malade l'exige. Il y a deux approches possibles à la mise au point d'une telle sonde universelle: a) combiner en une sonde unique les sondes spécifiques de chaque espèce ou b) identifier et isoler une séquence de bases d'ADN commune à toutes les espèces. La première de ces approches suppose que l'on puisse disposer de sondes spécifiques de toutes les espèces de plasmodies humaines, ce qui n'est pas le cas à l'heure actuelle. La seconde semble plus réalisable pour le moment, puisqu'on a identifié chez *P. gallinaceum* une séquence génique répétée qui semble être commune à toutes les plasmodies, mais pas à l'ADN des autres organismes (Wirth, communication personnelle, 1985).

### Simplification du test d'hybridation

**Marquage de la sonde.** On emploie actuellement des sondes marquées au  $^{32}\text{P}$  puisqu'elles rendent le test très sensible. Cet isotope a comme inconvénient sa courte période radioactive; en outre, les difficultés liées à la manipulation de toute substance radioactive rendent son emploi impossible en dehors d'un laboratoire bien équipé. Il est par conséquent très souhaitable de mettre au point des méthodes non radioactives pour le marquage des sondes. Les progrès dans ce domaine ont été lents et à l'heure actuelle, seuls les nucléotides marqués à la biotine, comme l'uridine triphosphate (UTP), semblent promis à un certain avenir. Malheureusement, la préparation de l'ADN marqué à la biotine est difficile et sa sensibilité est au moins 10 fois inférieure à celle des meilleures méthodes radioactives. De plus, l'application de cette méthode à la détection des plasmodies dans le sang est, dans une certaine mesure, limitée par le fait que la biotine est une substance produite naturellement chez l'homme.

Des méthodes différentes de marquage de l'ADN sont actuellement mises au point à d'autres fins diagnostiques, et il faut savoir quel est leur intérêt dans le paludisme. Elle comprennent, entre autres:

a) La modification chimique de l'ADN suivie d'une détection à l'aide d'anticorps spécifiques. C'est un domaine où les progrès sont rapides et qui devrait aboutir à des résultats pratiques dans un proche avenir. Un exemple de ce type d'approche est le marquage de l'ADN par insertion d'un groupe sulfone antigénique dans les résidus cytosine des sondes, la détection de l'hybridation étant réalisée par une réaction immunoenzymatique. Il existe dans le commerce un nécessaire d'épreuve basé sur ce principe, mais il reste à vérifier si son emploi peut s'appliquer au diagnostic du paludisme.

b) Le marquage direct ou indirect de l'ADN à l'europium, un métal rare. Des nécessaires de diagnostic basés sur ce principe sont actuellement en cours de mise au point.

c) Des tests immunofluorimétriques pour la détection des acides nucléiques, semblables à ceux mis au point pour la détection des antigènes.

**Méthode d'hybridation sur filtre.** Les méthodes actuelles d'hybridation sur filtre comprennent de nombreuses étapes qui les rendent assez incommodes. Il convient donc de vérifier dans quelle mesure on pourrait abréger certaines d'entre elles ou même les supprimer. Par exemple:

a) le prélèvement de sang: pourrait-il être appliqué directement sur le papier filtre, en prenant par exemple de grandes feuilles de papier-filtre épais Whatman, plutôt que de transférer l'échantillon d'un tube capillaire dans un flacon puis sur un filtre de

nitrocellulose?

b) le chauffage du filtre: est-il indispensable, ou pourrait-il être remplacé par d'autres méthodes ne nécessitant pas de hautes températures?

c) l'étape de préhybridation: est-elle absolument nécessaire et si oui, pourrait-on réduire sa durée au minimum?

d) la durée de la réaction d'hybridation: cette étape très longue pourrait-elle être raccourcie en modifiant les conditions de la réaction? De plus, de hautes températures ne seraient peut-être plus nécessaires si l'on ajoutait du formamide au tampon.

Il est peut-être possible de simplifier la méthode classique d'hybridation sur filtre en la faisant par exemple en phase liquide, ce qui serait bien plus rapide que le passage à travers une membrane. De plus, des méthodes simples de détection pourraient être basées sur la chromatographie sur hydroxyapatite, qui distingue à coup sûr un fragment d'ADN monocaténaire d'un fragment hybridé avec de l'ADN ou de l'ARN.

On pourrait aussi employer des sondes liées à une matrice solide, par exemple un bâtonnet enrobé d'une matrice appropriée. Ainsi, l'ADN ou l'ARN de l'échantillon pourrait être détecté par hybridation à l'aide d'une réaction de compétition avec une sonde marquée qui reconnaîtrait la séquence sur la phase solide. Il faut bien sûr affiner ces méthodes avant d'en faire des tests diagnostiques opérationnels.

*Conception d'un nécessaire pour test.* Il faut soigneusement évaluer toutes les techniques sur le terrain avant de chercher à préconiser un protocole d'épreuve normalisé. Cependant, une fois élaborés un protocole et un système d'épreuve uniformes, il faudra concevoir un nécessaire adapté à l'utilisation sur le terrain. L'expérience acquise dans d'autres domaines a montré la nécessité d'inclure dans chaque nécessaire tout le matériel et les produits indispensables à la réussite du test. En outre, ce nécessaire doit comprendre des témoins positifs et négatifs pour tous les paramètres étudiés, et le contrôle de la qualité des résultats doit faire partie de tout protocole. Il sera probablement nécessaire de mettre au point des réactifs de très longue durée de conservation, car il a été prouvé que, pratiquement, si l'une quelconque des substances nécessaires au test, conservée à température ambiante ou au réfrigérateur, a une limite d'utilisation de moins d'un an, cela représente un inconvénient majeur. Un nécessaire dont les échantillons ou les réactifs doivent être conservés au-dessous de +4 °C est pratiquement inutilisable sur le terrain.

Quand une nouvelle technique s'est montrée réalisable et adaptable aux conditions du terrain, il faut normaliser au maximum son exécution. Il faut examiner et évaluer très complètement chaque

élément du nécessaire afin de savoir quelle présentation (formulations, emballage, etc.) donnera les meilleurs résultats au niveau *opérationnel* et sera la plus rentable. De plus, il ne faut choisir, dans la mesure du possible, que du matériel courant et facile à se procurer.

Dès que les éléments d'un système de test auront été choisis, il faudra s'efforcer de les conserver et de n'en changer qu'après évaluation soignée et complète des nouveaux, pour ce qu'ils sont et par rapport aux autres éléments normalisés du système adopté à l'origine.

#### *Evaluation sur le terrain*

Des études complémentaires de validation des sondes d'ADN actuellement disponibles et de celles qui sont à l'étude sont nécessaires. Cette validation devra d'abord se faire sous forme d'études inter-laboratoires appliquant différentes techniques aux prélèvements provenant d'études cliniques et épidémiologiques. Les techniques les plus prometteuses seront ensuite sélectionnées pour des essais en double aveugle sur le terrain, de manière à comparer les résultats de la sonde avec ceux des techniques microscopiques classiques. Ces études pourront comprendre:

a) Des épreuves de spécificité des sondes. Ces recherches porteront sur différentes espèces de plasmodies humaines dans diverses régions géographiques, ainsi que dans diverses localités à l'intérieur d'un même pays, afin de déterminer la spécificité de souche.

b) Des épreuves de sensibilité des sondes. Ces études, qui porteront sur des prélèvements de sang provenant en particulier de sujets ayant de très faibles parasitémies, pourront être faites sur des populations immunes ou semi-immunes de régions d'hyperendémie.

c) Des études sur la sensibilité du test: son aptitude à déceler une disparition réelle des parasites après un traitement radical, et la présence résiduelle d'ADN parasitaire dans le sang après suppression de la parasitémie. Elles pourraient être facilement réalisées dans des dispensaires antipaludiques où les malades sont suivis après traitement radical.

#### *Autres applications*

En dehors de leur normalisation pour le diagnostic des infections sanguines, les sondes d'ADN pourraient être utiles dans d'autres domaines, par exemple:

- l'examen systématique du sang dans les banques de sang;
- la détection des parasites chez le moustique;
- la détection des isolements pharmacorésistants (si

l'on peut mettre au point des sondes spécifiques de ces isolements).

Il a déjà été prouvé que des sondes d'ADN pouvaient déceler des sporozoïtes chez le moustique, et la mise au point de nécessaires pour la détection d'antigènes spécifiques d'espèce de ces stades est bien avancée.

\*  
\* \* \*

- C. C. Draper, Department of Tropical Hygiene, London School of Hygiene and Tropical Medicine, Londres, Angleterre
- B. M. Greenwood, Medical Research Council Laboratories, Fajara, Gambie
- M. Holmberg, Département de Génétique médicale, Centre biomédical, Université d'Uppsala, Uppsala, Suède
- Sakol Panyim, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thaïlande
- U. Pettersson, Département de Génétique médicale, Centre biomédical, Université d'Uppsala, Uppsala, Suède
- Y. Pollack, Département de Microbiologie et d'Immunologie, Université du Neguev Ben Gourion, Jérusalem, Israël
- J. Scaife, Department of Molecular Biology, University of Edinburgh, Edimbourg, Ecosse
- Łaksami Suebsaeng, Malaria Division, Department of Communicable Diseases, Ministry of Public Health, Bangkok, Thaïlande
- D. Wirth, Department of Tropical Health, Harvard School of Public Health, Boston, MA, Etats-Unis d'Amérique

#### Secrétariat OMS

- P. F. Beales, Programmation et Formation, Programme d'Action antipaludique, OMS, Genève, Suisse
- E. B. Doberstyn, Programme spécial PNUD/Banque mondiale/OMS de Recherche et de Formation concernant les Maladies tropicales, et Recherche et Renseignements Techniques, Programme d'Action antipaludique, OMS, Genève, Suisse
- L. J. Martinez, Programme spécial PNUD/Banque mondiale/OMS de Recherche et de Formation concernant les Maladies tropicales, et Recherche et Renseignements Techniques, Programme d'Action antipaludique, OMS, Genève, Suisse
- J. A. Najera, Programme d'Action antipaludique, OMS, Genève, Suisse
- E. Onori, Méthodologie et Evaluation épidémiologiques, Programme d'Action antipaludique, OMS, Genève, Suisse
- D. Payne, Programme spécial PNUD/Banque mondiale/OMS de Recherche et de Formation concernant les Maladies tropicales, et Recherche et Renseignements Techniques, Programme d'Action antipaludique, OMS, Genève, Suisse
- P. I. Trigg, Recherche et Renseignements Techniques, Programme d'Action antipaludique, OMS, Genève, Suisse
- W. H. Wernsdorfer, Recherche et Renseignements Techniques, Programme d'Action antipaludique, OMS, Genève, Suisse

#### REMERCIEMENTS

Mlle Marina Pearce doit être remerciée pour l'aide qu'elle a apportée à la réalisation de la figure 1.

#### BIBLIOGRAPHIE

- ASLUND, L. ET AL. Highly reiterated non-coding sequence in the genome of *Plasmodium falciparum* is composed of 21 base-pair tandem repeats. *Journal of molecular biology*, **185**: 509-516 (1985).
- BARKER, R. H. ET AL. Specific DNA probe for the diagnosis of *P. falciparum* malaria. *Science*, **231**: 1434-1436 (1986).
- BHASIN, V. K. ET AL. Variations in the organization of repetitive DNA sequences in the genomes of *Plasmodium falciparum* clones. *Molecular and biochemical parasitology*, **15**: 149-158 (1985).
- COPPEL, R. L. ET AL. *Plasmodium falciparum*: differentiation of isolates with DNA hybridization using antigen gene probes. *Experimental parasitology*, **60**: 82-89 (1985).
- FRANZÉN, L. ET AL. Analysis of clinical specimens by hybridisation with probe containing repetitive DNA from *Plasmodium falciparum*. A novel approach to malaria diagnosis. *Lancet*, **1**: 525-528 (1984).
- HOLMBERG, M. ET AL. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection by a spot hybridization assay: specificity, sensitivity and field applicability. *Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé*, **64**: 579-585 (1986).
- OQUELDO, P. ET AL. Characterisation of a repetitive DNA sequence from the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and biochemical parasitology*, **18**: 89-101 (1986).
- POLLACK, Y. ET AL. Detection of *Plasmodium falciparum* in blood using DNA hybridization. *American journal of tropical medicine and hygiene*, **34**: 663-667 (1985).
- THAITHONG, S. ET AL. Clonal diversity in a single isolate of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **78**: 242-245 (1984).
- VAN DER PLOEG, L. H. T. ET AL. Chromosome-sized DNA molecules of *Plasmodium falciparum*. *Science*, **229**: 658-661 (1985).
- OMS Série de Rapports techniques, No. 743 (*The biology of malaria parasites: report of a WHO Scientific Group*) (version française en préparation).