

MINISTRE DE L'ÉDUCATION

UNIVERSITÉ DE BAMAKO

REPUBLIQUE DU MALI

UN PEUPLE-UN BUT-UNE FOI

FACULTE DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

Année universitaire : 2004-2005

Thèse N°.....

ANALYSE DIFFÉRENTIELLE DE L'EXPRESSION GÉNÉRIQUE
CHEZ DES ENFANTS ATTEINTS DE PALUDISME NON
COMPLIQUÉ PAR LA TECHNIQUE DE MICROARRAY

THESE

Présentée et soutenue publiquement le2005
devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Par **Mr. Ousmane H CISSE**

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR EN PHARMACIE**

(DIPLOME D'ÉTAT)

JURY

- ❖ Président : Professeur Gaoussou KANOUTE
- ❖ Membre : Docteur Amadou MAÏGA
- ❖ Membre : Docteur Mohamed S. MAÏGA
- ❖ Directeur : Professeur Amadou DIALLO
- ❖ Co Directeur : Docteur Ousmane KOITA

Les travaux ont été réalisés à l'ASACOBA de Banconi, au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) et à l'Université de Tulane

**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-
STOMATOLOGIE
ANNEE UNIVERSITAIRE 2004-2005**

ADMINISTRATION

DOYEN : **MOUSSA TRAORE – PROFESSEUR**
1^{er} ASSESSEUR : **MASSA SANOGO – MAÎTRE DE CONFÉRENCES**
2^{ème} ASSESSEUR : **GANGALY DIALLO – MAÎTRE DE CONFÉRENCES**
AGRÉGÉ
SECRETAIRE PRINCIPAL : **YENIMEGUE ALBERT DEMBELE –**
MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ
AGENT COMPTABLE : **MADAME COULIBALY FATOUMATA TALL**
CONTROLEUR DES FINANCES

PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA : Ophtalmologie
Mr Bocar SALL : Orthopédie Traumatologie –Secourisme
Mr Souleymane SANGARE : Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA : Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE : Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY : Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE : Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE : Pharmacognosie
Mr Mohamed TOURE : Pédiatrie
Mr Ali Nouhoum DIALLO : Médecine interne
Mr Aly GUINDO : Gastro-entérologie

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE :	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE :	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE :	Orthopédie – Traumatologie
	Chef de D.E.R.
Mr Kalilou OUATTARA :	Urologie
Mr Amadou DOLO :	Gynéco Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED :	ORL

2. MAÎTRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Mr Abdoulaye DIALLO :	Ophtalmologie
Mr Djibril SANGARE :	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE dit DIOP :	Chirurgie Générale
Mr Abdoulaye DIALLO :	Anesthésie – Réanimation
Mr Gangaly DIALLO :	Chirurgie Viscérale

3. MAÎTRES DE CONFÉRENCES

Mme SY Aïda SOW :	Gynéco Obstétrique
Mr Salif DIAKITE :	Gynéco Obstétrique

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE :	Gynéco Obstétrique
Mr Mamadou TRAORE :	Gynéco Obstétrique
Mr Sadio YENA :	Chirurgie Générale
Mr Filifing SISSOKO :	Chirurgie Générale
Mr Issa DIARRA :	Gynéco Obstétrique
Mr Youssouf COULIBALY :	Anesthésie - Réanimation
Mr Samba Karim TIMBO :	O.R.L.

Mme TOGOLA Fanta KONIPO :

O.R.L.

5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mme Djénéba DOUMBIA

Anesthésie / Réanimation

Mr Mamadou L. DIOMBANA :

Stomatologie

Mr Sékou SIDIBE :

Orthopédie - Traumatologie

Mr Abdoulaye DIALLO :

Anesthésie - Réanimation

Mr Tiéman COULIBALY :

Orthopédie - Traumatologie

Mme TRAORE J. THOMAS :

Ophtalmologue

Mr Nouhoum ONGOÏBA :

Anatomie & Chirurgie Générale

Mr Zanafon OUATTARA :

Urologie

Mr Zimogo Zié SANOGO :

Chirurgie Générale

Mr Adama SANGARE :

Orthopédie - Traumatologie

Mr Sanoussi BAMANI :

Ophtalmologie

Mr Doulaye SACKO :

Ophtalmologie

Mr Ibrahim ALWATA :

Orthopédie - Traumatologie

Mr Lamine TRAORE :

Ophtalmologie

Mr Mady MAKALOU :

Orthopédie/ Traumatologie

Mr Aly TEMBELY :

Urologie

Mr Niani MOUNKORO :

Gynécologie/ Obstétrique

Mr Tiémoko D. COULIBALY :

Odontologie

Mr Souleymane TOGORA :

Odontologie

Mr Mohamed KEITA :

ORL

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO :	Chimie Générale & Minérale
Mr Siné BAYO :	Anatomie-Pathologie-Histoembryologie
Mr Amadou DIALLO :	Biologie
Mr Moussa HARAMA :	Chimie Organique
Mr Ogobara DOUMBO :	Parasitologie – Mycologie

2. MAÎTRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Mr Yénimégué Albert DEMBELE :	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA :	Immunologie- Chef de D.E.R.
Mr Amadou TOURE :	Histoembryologie
Mr Flabou BOUGOUDOGO :	Bactériologie – Virologie

3. MAÎTRES DE CONFÉRENCES

Mr Bakary M. CISSE :	Biochimie
Mr Abdrahamane S. MAÏGA :	Parasitologie
Mr Adama DIARRA :	Physiologie
Mr Mamadou KONE :	Physiologie
Mr Massa SANOGO :	Chimie Analytique

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE :	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE :	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO :	Malacologie – Biologie Animale
Mr Abdrahamane TOUNKARA :	Biochimie
Mr Ibrahim I. MAÏGA :	Bactériologie – Virologie
Mr Moussa Issa DIARRA :	Parasitologie
Mr Amagana DOLO :	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE :	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie

Mr Souleymane DIALLO

Bactériologie/ Virologie

Mr Cheick Bougadari TRAORE

Anatomie pathologie

Mr Lassana DOUMBIA

Chimie Organique

5. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY :

Hématologie

Mr Mahamadou A. THERA :

Parasitologie

Mr Mangara M. BAGAYOKO :

Entomologie Moléculaire Médicale

Mr Guimogo DOLO :

Entomologie Moléculaire Médicale

Mr Abdoulaye TOURE :

Entomologie Moléculaire Médicale

Mr Djbril SANGARE :

Entomologie Moléculaire Médicale

Mr Mouctar DIALLO :

Biologie/ Parasitologie

Mr Boubacar TRAORE :

Immunologie

Mr Bokary SACKO :

Biochimie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPÉCIALITÉS MÉDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY :	Médecine Interne
Mr Mamadou K. TOURE :	Cardiologie
Mr Mahamane MAÏGA :	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE :	Psychiatrie – Chef de D.E.R.
Mr Moussa TRAORE :	Neurologie
Mr Issa TRAORE :	Radiologie
Mr Mamadou M. KEITA :	Pédiatrie
Mr Hamar A. TRAORE :	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO :	Hématologie
Mr Moussa Y. MAIGA :	Gastro-entérologie/ Hépatologie

2. MAÎTRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Mr Toumani SIDIBE :	Pédiatrie
Mr Bah KEITA :	Pneumo-phtisiologie
Mr Boubacar DIALLO :	Cardiologie
Mr Somita KEITA :	Dermato Léprologie
Mr Abdel Kader TRAORE :	Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE :	Radiologie

3. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Mamadou DEMBELE :	Médecine Interne
Mr Mamady KANE :	Radiologie
Mr Tatiana KEITA :	Pédiatrie
Mme TRAORE Mariam SYLLA :	Pédiatrie
Mr Adama D. KEITA :	Radiologie
Mme SIDIBE Assa TRAORE :	Endocrinologie
Mme Habibatou DIAWARA :	Dermatologie

4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Bou DIAKITE :	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO :	Gastro-entérologie
Mr Saharé FONGORO :	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY :	Psychiatrie
Mr Kassoum SANOGO :	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE :	Cardiologie
Mr Mahamadou B. CISSE :	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA :	Psychiatrie
Mme Diarra Assétou SOUCKO	Médecine interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou B. TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépatogastro-entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépatogastro-entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie
Mr Daouda MINTA	Maladies infectieuses
Mr Soungalo DAO	Maladies infectieuses

5. ASSISTANT

Mr Cheick Oumar GUINTO :	Neurologie
--------------------------	------------

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEUR

Mr Boubacar Sidiki CISSE :	Toxicologie
Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie Analytique Chef de D.E.R

3. MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS

Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique
--------------------	--------------------

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum HAIDARA	Législation
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Benoît KOUMARE	Chimie analytique
Mr Drissa DIALLO :	Matières Médicales
Mr Alou KEITA :	Galénique
Mr Ababacar I. MAÏGA :	Toxicologie
Mr Yaya KANE :	Galénique

5. ASSISTANTS

Mme Rokia SANOGO	Pharmacognosie
Mr Saibou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire

D.E.R. SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA : Santé Publique – **Chef de D.E.R.**

2. MAÎTRE DE CONFERENCES AGRÉGÉ

Mr Moussa A. MAÏGA : Santé Publique

3. MAÎTRE DE CONFERENCES

Mr Sanoussi KONATE : Santé Publique

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE : Santé Publique

Mr Adama DIAWARA : Santé Publique

Mr Hamadoun SANGHO : Santé Publique

Mr Massambou SACKO : Santé Publique

Mr Moussa A. DICKO : Santé Publique

5. ASSISTANTS

Mr Samba DIOP : Anthropologie Médicale

Mr Seydou DOUMBIA : Epidémiologie

Mr Oumar THIERO : Biostatistique

CHARGÉS DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N’Golo DIARRA :	Botanique
Mr Bouba DIARRA :	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO :	Physique
Mr Boubacar KANTE :	Galénique
Mr Souleymane GUINDO :	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA :	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA :	Nutrition
Mme MAÏGA Fatoumata SOKONA :	Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE :	Génétique
Mr Yaya COULIBALY :	Législation

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA :	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE :	Pharmacodynamie
Pr. Eric PICHARD :	Pathologie Infectieuse
Pr. Mounirou CISS :	Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP :	Biochimie

A ALLAH LE TOUT PUISSANT

C'est grâce à Toi Seigneur que tout a commencé et grâce à Toi que nous sommes là aujourd'hui.

Accepte ce travail comme signe de reconnaissance pour tous tes bienfaits.

ALLAH fait en sorte que ce travail soit bénéfique pour nous tous afin que nous puissions T'adorer. Louanges à Toi et paix et salut sur ton prophète Mohamed.

Amen.

DEDICACES*A mes Parents*

Je ne trouve pas les mots pour exprimer ma pensée. A Vous, sans qui je serais rien, merci du fond du cœur pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour que je sois l'homme que je suis aujourd'hui. Rien de ce que je pourrais faire sur cette terre ne pourra vous récompenser, à part de faire de mon mieux pour que vous soyez fières de moi.

Maman adorée sache que mon souhait le plus cher est que tu sois fière de ton fils.

A Ma mère Dr. CISSÉ Aminata GAKOU, mon père Dr. Hamadoun O CISSE, mon frère Mohamed, ma sœur Néné et mon cousin Dr. Sory, je dédie ce modeste travail qui n'est que le fruit de l'éducation et de l'amour que vous m'avez donné.

Qu'ALLAH le tout puissant vous protège et vous guide.

A tous les membres de ma famille

*Particulièrement à mes tantes Dr. Youma GAKOU, Djenné Gakou, Atou Gakou, Babou DICKO, Je vous remercie infiniment
Ce travail est le vôtre. Qu'ALLAH renforce la cohésion au sein de notre famille et nous guide dans nos choix.*

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier la population de Banconi pour avoir participer à cette étude. Je suis convaincu qu'un jour ces travaux vous seront profitable.

Mes remerciements vont également à l'égard de tout le personnel de l'ASACOBÀ de Banconi qui n'a ménagé aucun effort dans l'accomplissement de cette étude malgré leurs multiples occupations.

A mes aînés Dr. Bagayoko, Dr. Sissako, Dr. Coulibaly, Dr. Sangaré, Dr. Mounkoro, Dr. Amos Fatoumata Alzouma, Dr. Ibrah Mahamadou, Dr. Madama Bouaré.

A mes promotionnaires Dr. Aissata Cissé, Diawara Zibo, Check Dembélé, Karim Coulibaly, Penda M Thiam, Gaoh S. Hadiza.

A tous les auditrices et auditeurs de DEA à la Faculté de Sciences et Techniques en particulier à Astan Traoré, Rabiataou Diarra, Bintou Ly, Fanta Tounkara

A tous les stagiaires du LBMA : Dembélé deKoro, Mangara Salif, Cissé Moussa, SamaKé Issoufou, Rossy, Coulibaly Bejame, SamaKé Salimata, Doumbia Z, Sangaré Mahamadou, Dicko Alpha, Sangaré Koutou.

A tout le personnel du LBMA en particulier à la grande sœur Kady Bamba, Koro Diakité, Madou Dao, Fabla Fofana, Sinayogo.

Au Dr. Coulibaly Djéneba Diallo et tout le personnel de la Pharmacie du Grand Marché.

Au Dr. Diallo Fanta Diallo, Pharmacie du Souvenir.

Au Dr. Bah Aminata Diallo et tout le personnel du Laboratoire d'analyses bio médicales « RIVE DROITE ».

A tout le personnel de la Pharmacie AMINA.

Aux Dr. Youssou Fofana, Dr. Alhassane Ba, Dr. Moctar Kanadji, Abdoul Karim Sangaré, Dr. Binta Diallo, Dr. Judith Mogobet ... merci pour votre soutien.

Au Pr. Donald Krogstad et à James Colborn de Tulane University, New Orléans, LA pour votre soutien et votre patience.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Gaoussou KANOUTE

- ❖ Directeur général du Laboratoire National de la Santé
- ❖ Professeur agrégé en Chimie analytique
- ❖ Chef de DER des Sciences Pharmaceutiques à la FMPOS.

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples sollicitations. Vos connaissances ainsi que vos hautes qualités humaines forcent notre admiration et notre profond respect.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre profonde gratitude.

A notre Maître et juge

Docteur Mohamed S. MAIGA

- ❖ Maître de conférence en Ecotoxicologie
- ❖ Chargé des cours de Biostatistiques à la FAST

Cher Maître,

Nous ne saurons jamais combien vous remercier pour avoir bien voulu juger ce travail. Votre constante disponibilité ainsi vos hautes connaissances scientifiques ne nous ont jamais fait défaut.

Veillez, cher Maître recevoir nos remerciements les plus sincères.

A notre Maître et juge

Docteur Amadou MAÏGA

- ❖ Maître assistant en Sciences mathématiques appliquées
- ❖ Chargé des cours de Mathématiques et d'Analyse numérique à la FAST

Cher Maître,

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail. Nous vous exprimons notre infinie gratitude pour votre disponibilité. La rigueur dont vous faites preuve lors de la transmission de vos connaissances fait de vous un homme remarquable.

Daignez, cher Maître accepter nos humbles remerciements et notre profond respect.

A notre Maître et directeur de Thèse

Professeur Amadou DIALLO

- ❖ Professeur de Biologie à la FMPOS
- ❖ Vice recteur de l'Université de Bamako
- ❖ Responsable des cours de Biologie animale et Zoologie à la FMPOS

Cher Maître,

Nous avons eu l'honneur de bénéficier de votre enseignement. L'étendue de vos connaissances et vos qualités humaines nous a impressionnée. Vous êtes pour nous un modèle de probité et de rigueur dans le travail.

Soyez rassuré, cher Maître, de notre profonde gratitude.

A notre Maître et co-directeur de thèse

Docteur Ousmane KOITA

- ❖ Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée à la Faculté de Sciences et Techniques
- ❖ Directeur adjoint du programme de recherche NIAID/NIH/FMPOS sur le Sida et la tuberculose
- ❖ Chargé de cours de Biologie moléculaire à la FAST

Cher Maître ;

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait en nous confiant ce travail. Votre rigueur scientifique ainsi votre très grande simplicité nous ont profondément marquées.

Veillez trouver ici, cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance et notre respectueuse admiration.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
<hr/>	
OBJECTIFS	5
<hr/>	
II. GENERALITES	5
1. Epidémiologie.....	7
2. Cycle de vie du parasite.....	8
3. Physiopathologie.....	10
4. Système immunitaire de l'hôte.....	11
4.1 Immunité innée.....	11
4.2 Immunogénétique de la réponse de l'hôte humain.....	14
5 Cas spécifique l'enfant.....	18
6. Méthodes de diagnostic.....	19
7. Les molécules antipaludiques.....	26
8. Les méthodes utilisées pour l'étude de l'expression génétique.....	28
8.1 Isolation d'ARN total.....	28
8.2 Techniques d'analyse des ARN	28
9. Aspects spécifiques et challenges.....	36
IV. METHODOLOGIE	38
1. Démarche méthodologique.....	39
2. Matériels et méthodes.....	41
2.1 Cadre et lieu d'étude.....	41
2.2 Population d'étude.....	42
2.3 Période d'étude.....	43
2.4 Echantillonnage.....	43
2.5 Organisation du travail.....	43
2.6 Techniques de l'étude.....	44
2.7 Analyse Microarray	57

2.8. Validation des données par la qRT-PCR : Méthode de Taq Man....62

V. RESULTATS	63
1. Identification des patients.....	64
1.1 Résultats cliniques.....	64
1.2 Résultats parasitologiques.....	66
2. Optimisation des techniques de lymphoséparation.....	71
3. Examen des molécules d'ARN total.....	73
3.1 Evaluation de la concentration et la pureté des échantillons	73
3.2 Evaluation de l'intégrité des échantillons par électrophorèse.....	75
3.3 Validation des échantillons par le Bioanalyser 2100 Agilent.....	77
4. Résultats des microarrays.....	78
4.1 Résultats par comparaison des stades A et C	79
4.2 Résultats par comparaison des stades A, B et C.....	81
4.3 Résultats par comparaison des stades A, B et C avec seuil de filtrage 1,5.....	90
VI. COMMENTAIRES ET DISCUSSION	92
VII. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	104
VIII. ANNEXES	107
Annexe 1 : Extraction d'ADN génomique avec le QIAmp® DNA Mini Kit... 108	
Annexe 2 : Extraction d'ARN avec le Kit RiboPure™-Blood	110
Annexe 3 : Protocole pour l'électrophorèse d'ARN total.....	114
Annexe 4 : Lavage de l'ARN total avec le Kit Rneasy® Cleanup.....	116
IX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	117
X. RESUME	127

LISTE DES FIGURES

1.	Cycle de vie de <i>Plasmodium falciparum</i>	9
2.	Structure du gène de la MSP-1.....	21
3.	Structure des 4 allotypes du bloc 2 de la MSP-1.....	22
4.	Principe de l'hybridation.....	31
5.	Gene Chip expression Array Design.....	33
6.	Procédé de la méthode photolithographique.....	35
7.	Carte du District de Bamako	41
8.	Papier filtre avec des cercles (Confetti).....	46
9.	Schéma de la « Nested PCR » ou PCR nichée.....	48
10.	Schéma de la méthodologie des puces à oligonucléotides.....	59
11.	Goutte épaisse positive chez l'échantillon 14-4.....	66
12.	Evolution de la souche K1 chez le patient 14-4.....	69
13.	Evolution des souches allotypes RO33 chez les patients.....	70
14.	Electrophorèse d'ARN total isolé à partir de la fraction leucocytaire ponctionnée sur tube avec anticoagulant simple.....	71
15.	Isolation d'ARN total à partir de cellules mononucléaires obtenues par les méthodes des tubes BD Vacutainer CPT™ et LSM	72
16.	Electrophorèse d'ARN total des échantillons 14-3B et 14-4B.....	75
17.	Validation de l'ARN total par le Bioanalyzer 2100 (Agilent®).....	77
18.	Profil d'expression global des gènes durant les stades A et C.....	79
19.	Profil d'expression global des gènes durant les stades A, B et C.....	81
20.	MSP-1 et Profil d'expression des gènes du patient 13-8.....	83
21.	MSP-1 et Profil d'expression des gènes du patient 13-13.....	84
22.	MSP-1 et Profil d'expression des gènes du patient 13-14.....	85
23.	MSP-1 et Profil d'expression des gènes du patient 14-3.....	86
24.	MSP-1 et Profil d'expression des gènes du patient 14-4.....	87
25.	MSP-1 et Profil d'expression des gènes du patient 214.....	88
26.	Profil d'expression global des gènes durant les stades A, B et C des patients avec un seuil de filtrage de 1,5.....	90

LISTE DES TABLEAUX

1. Séquences des amorces utilisées.....	47
2. Concentrations des réactifs pour l'amplification des Blocs 1 et 5.....	49
3. Concentrations des réactifs pour l'amplification du Bloc 2.....	49
4. Caractéristiques de la puce Affymetrix HG-133 2.0 Chip Plus.....	57
5. Distribution des échantillons suivant le sexe et l'âge.....	64
6. Signes cliniques.....	64
7. Date de prélèvement et molécules antipaludiques administrées.....	65
8. Stades d'évolution et densité parasitaire.....	67
9. Identification des parasites par PCR au stade A.....	67
10. Identification des parasites par PCR au stade B.....	67
11. Identification des parasites par PCR au stade C.....	68
12. Répartition de la clonalité.....	69
13. Dosage spectrophotométrique de l'ARN total au stade A.....	73
14. Dosage spectrophotométrique de l'ARN total au stade B.....	74
15. Dosage spectrophotométrique de l'ARN total au stade C.....	74
16. Taille des sous unités ribosomales 28s et 18S de l'ARN total.....	76
17. Résultats du 1 ^{er} filtrage ANOVA.....	80
18. Résultats du 2 ^{ème} filtrage ANOVA.....	89
19. Résultats de gènes représentatifs identifiés par la méthode de filtrage Fold Change.....	91

LISTES DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNc :	Acide Ribonucléique complémentaire
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
CD63 :	Cellule de Différenciation antigénique 63
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSP :	Circumsporozoite Surface Protein
EDTA :	Ethylène diaminetetra acetic acid
FAST :	Faculté des Sciences et Techniques
Fc γ R :	Récepteur aux IgG
ICAM-1 :	Inter Cellular Adhesion Molecule-1
IFN- γ :	Interféron- γ
I κ B :	Inhibiteur κ B
IKK β :	I κ B kinase β
IL :	Interleukine
Ig :	Immunoglobuline
LSA-1 :	Liver Stage Antigen-1
MSP-1 :	Merozoite surface protéine 1
MyD88 :	Myeloïd Differentiation factor 88
NF- κ B:	Nuclear factor Kappa -B
nt :	Nucleotide (s)
Pb :	Paire de bases
PCR :	Polymerase chain reaction
Rpm :	Rotation par minutes
TBE buffer :	Tris buffer (100mM, pH 8,3), borate (90mM), EDTA (1.0mM)
TE buffer :	Tris HCL buffer (10mM pH 8.0) EDTA (1mM)
VCAM-1:	Vascular Adhesion molecule-1

« ...Nous vivons une période extraordinaire en matière de développement des sciences biologiques. Au fur et à mesure de l'application des techniques de biologie cellulaire et moléculaire à la recherche médicale, la plupart des énigmes de la pathologie humaine seront résolues dans les toutes prochaines années...je suis convaincu que les Sciences médicales vont connaître la phase la plus productive et la plus passionnante de leur histoire.

Heureux les jeunes praticiens qui vont en être les acteurs ! »

Sir David J. Weatherall

(In « The New Genetics and Clinical Practice »

Oxford University Press, 1985)

INTRODUCTION

Le paludisme est un fléau dans le monde. Selon l'OMS, cette maladie touche chaque année 350 à 500 millions de personnes, soit entre 5,6 et 8% de la population mondiale (OMS 2003) et entraîne plus d'un million de décès dans le monde. En Afrique, le paludisme tue un enfant toutes les 30 secondes (OMS). C'est une maladie parasitaire transmise à l'homme par la piqûre d'un moustique du genre *Anopheles*. Quatre espèces de parasite *Plasmodium* sont inféodées à l'homme. Leur pathogénie et leur évolution sont très différentes. La plus dangereuse d'entre elles est l'espèce *P.falciparum*, responsable de la presque totalité des décès par neuropaludisme, elle est la plus répandue en Afrique subsaharienne, ainsi que dans certaines parties de l'Amérique du Sud, de l'Asie du sud est et de l'Océanie.

Au Mali, le paludisme serait responsable de 14 à 20% de mortalité infantile juvénile (Doumbo et *al.*, 1989). Il faut noter que 36% des fièvres sont d'origine palustre chez les enfants de moins de 10 ans pendant la saison des pluies et que 12 à 15 % des hospitalisations des adultes sont imputables au paludisme (Haidara, 1989). Toutes les espèces plasmodiales (Koita, 1988) circulent au Mali.

En dépit de nombreuses années d'intense recherche, aucun vaccin efficace n'est encore disponible et le parasite développe une résistance grandissante aux médicaments couramment utilisés. De nouvelles voies pour combattre la maladie devront donc être identifiées. Elles passent par une meilleure compréhension de l'interaction entre le système immunitaire de l'homme et le parasite. En terme génétique, ceci implique l'identification de gènes impliqués dans la réponse de l'hôte face à l'infection.

De nombreuses études génétiques ont permis d'identifier les gènes impliqués dans la résistance ou la susceptibilité aux formes graves du paludisme. Ces gènes interviennent essentiellement dans la structure ou le

métabolisme des globules rouges, dans l'adhésion cellulaire ou dans la réponse immunitaire, mais leur rôle est encore mal défini. De plus les gènes impliqués ne sont pas nécessairement les mêmes d'une population à l'autre et le contrôle des différents phénotypes liés au paludisme dépend probablement de nombreux gènes dont beaucoup restent à être identifiés et en particulier ceux qui interviennent dans le contrôle de la charge parasitaire sanguine (Abel et *al.*, 1992) et dans le contrôle de la réponse immune protectrice dirigée contre le parasite.

Le paludisme induit des modifications dans l'expression génétique des individus. Nous pensons que ces perturbations sont une réponse de l'hôte face à la maladie. Notre étude a pour but d'identifier et comparer les profils génétiques des patients au moment où ils présentent les symptômes cliniques spécifiques du paludisme à ceux qu'ils présentent après guérison. Cette approche s'inscrit donc dans le cadre de la recherche de nouveaux gènes qui auraient une expression perturbée pendant la maladie et qui seraient à la base des symptômes spécifiques observés lors de la consultation du malade.

En effet si le génome est identique dans chacune des cellules d'un organisme donné, en revanche, les gènes, eux, peuvent avoir une expression génique spécifique caractéristique d'un état donné (normal, pathologique ou en réponse à un stimulus particulier). L'expression des gènes s'effectue en 2 étapes: synthèse des ARNm (transcription) et synthèse des protéines (traduction). Une première représentation d'une cellule donnée peut donc être définie par l'ensemble des gènes qui s'y expriment à un instant donné, c'est à dire par son transcriptome (ensemble des ARNm) et par son protéome (ensemble des protéines présentes dans la cellule considérée).

Jusqu'à récemment les seules techniques valables pour étudier l'expression génétique étaient le Northern blot et la Real Time *RT-PCR*. Ces techniques bien que performantes sont très limitées par le nombre de gènes qui peut être analysé et par le temps qu'elles requièrent.

La technologie des puces à ADN ou Microarrays connaît à l'heure actuelle un essor exceptionnel et suscite un formidable intérêt dans la communauté scientifique. Grâce à cette méthodologie, la mesure simultanée du niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes voir d'un génome entier dans des dizaines de conditions différentes, physiologiques ou pathologiques, est aujourd'hui techniquement possible. Son utilité est scientifiquement incontestable car la connaissance du niveau d'expression d'un gène dans ces différentes situations constitue une avancée vers sa fonction mais également vers le criblage de nouvelles molécules ainsi que l'identification de cibles médicamenteuses et de nouveaux outils de diagnostic.

Vu les difficultés pour étudier les protéines exprimées nous avons choisi d'analyser cette expression génétique en passant par l'isolement et l'analyse directe des ARN messagers grâce à la technique de Microarray. Bien que le génome de l'homme ait été décrypté la fonction des milliers de gènes reste à être identifiée et leur degré de transcription à être évalué dans des conditions pathologiques bien déterminées.

OBJECTIFS :

1. Objectif général :

Analyser l'expression des gènes par la technique de Microarrays chez des enfants atteints de paludisme non compliqué.

2. Objectifs spécifiques :

- Identifier les gènes de l'hôte humain impliqués au cours du paludisme non compliqué à *Plasmodium falciparum* ;
- Comparer les niveaux d'expression des gènes avant, pendant et après traitement ;
- Rechercher les liaisons entre les génotypes du gène MSP-1 de *P. falciparum* et les gènes exprimés chez l'hôte humain.

GÉNÉRALITÉS

1. EPIDEMIOLOGIE :

1.1 Le paludisme au Mali :

Le Mali est un pays d'endémie palustre où les quatre formes humaines du *Plasmodium* ont été retrouvées (Koita, 1989). Il existe cinq faciès épidémiologiques (Doumbo, 1992).

Le paludisme sévit sur tout le territoire. Les statistiques nationales estiment que le paludisme est la première cause de mortalité (13%) et de morbidité (15,6%) dans la population générale (Doumbia, 1997). Les enfants et les femmes enceintes constituent le principal groupe à risque. Il constitue en outre la première cause de consultation dans les services de santé maternelle et infantile et dans les services de pédiatrie de l'hôpital GABRIEL TOURE soit 49,7% (Diawara S, 1997). Il occupe la deuxième place dans les étiologies des syndromes fébriles en médecine interne à l'hôpital Gabriel TOURE soit 12,8% (Haidara, 1989). La mortalité spécifique liée à cette érythrocytopathie dans la population des enfants de moins de 5 ans est estimée entre 25 et 35 % de la mortalité infanto juvénile globale (Kayentao., 1997).

1.2 Le paludisme en milieu urbain :

Les villes, à forte urbanisation présentent des prévalences faibles avec un risque élevé de symptômes sévères du paludisme. L'indice plasmodique de 11,7% et de l'indice splénique de 8,2% obtenus au cours d'une étude prospective dans la ville de Bamako permettent de classer la zone urbaine bamakoise en zone d'hypo endémie palustre (Doumbo et al., 1992). Durant la période propice à la transmission, il y a une forte prolifération des gîtes larvaires qui ne durent pas dans le temps. Durant la saison sèche, les points d'eau formés par les eaux usées ne sont pas propices à la prolifération d'*Anopheles gambiae*, le plus important vecteur du paludisme au Mali.

2. Cycle de vie du parasite :

Les plasmodies ont un cycle de vie très complexe qui comporte deux étapes essentielles (Voir figure 1): une phase asexuée chez l'homme et une phase sexuée chez le moustique. Ce cycle de vie correspond en fait à une suite de prolifération intense du parasite responsable de la maladie, et de différenciation cellulaire responsable de la dissémination du parasite.

L'homme est infecté lors d'une piqûre par un anophèle femelle qui lui injecte des sporozoïtes. Ces derniers migrent rapidement vers le foie par la circulation sanguine et pénètrent dans les cellules hépatiques où ils se divisent très activement pour donner naissance en quelques jours, à des dizaines de milliers de mérozoïtes. L'hépatocyte éclate pour donner naissance, en quelques jours à des dizaines de milliers de mérozoïtes de 2^{ème} génération. Chaque mérozoïte pénètre dans un globule rouge et se multiplie une fois de plus pour donner des schizontes. Lorsque ces derniers éclatent, les mérozoïtes ainsi libérés infectent de nouveaux globules rouges. En parallèle, des cellules sexuées mâles et femelles (gamétocytes) se forment dans le sang du sujet infecté. Lorsqu'un moustique pique un tel sujet, il ingère ces gamétocytes qui se transforment alors en gamètes. Leur fécondation engendre un œuf, l'ookinète qui se différencie en oocyste dans la paroi stomacale du moustique puis en sporozoïtes qui vont migrer vers les glandes salivaires du moustique. Un nouveau cycle peut alors commencer.

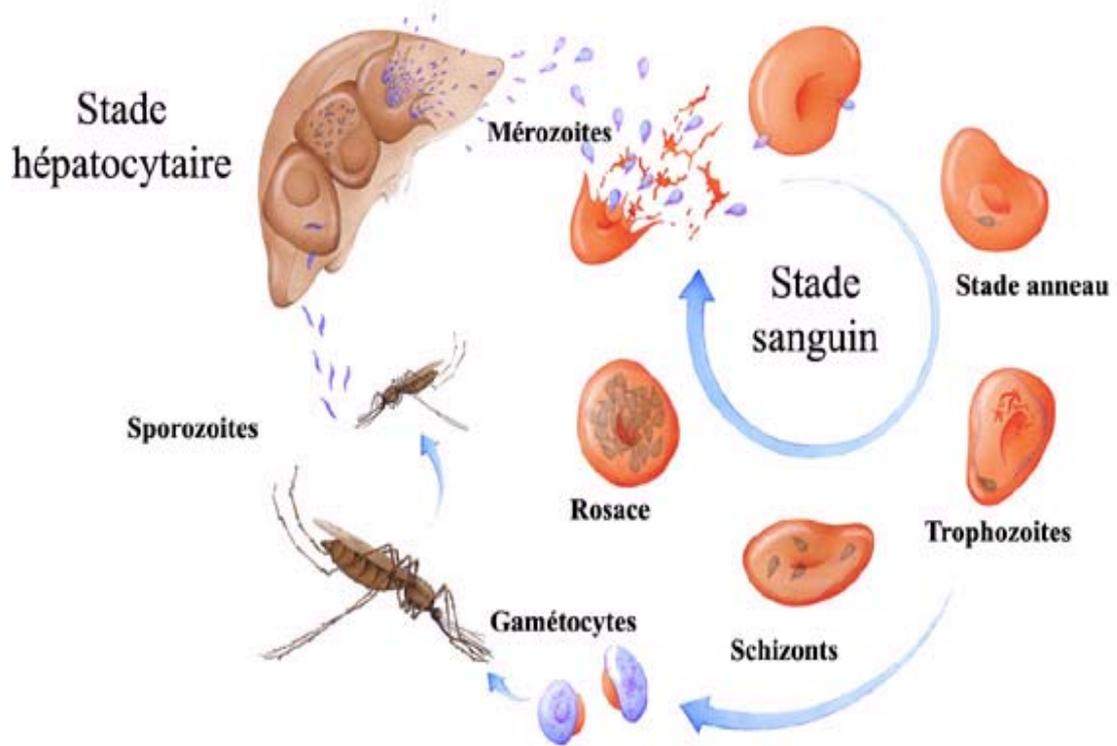


Figure.1 : Cycle de vie de *Plasmodium falciparum*
(Source : www.pasteur.fr/.../recherches-new-malaria.html.)

3. Physiopathologie :

Malgré la multitude des stades par lesquels évoluent les plasmodies au cours de leur développement chez l'homme (sporozoïtes, stade hépatique, stade érythrocytaire asexué et stade gamétocytaire), seuls les stades érythrocytaires asexués sont responsables de la maladie. Les accès palustres peuvent être plus ou moins graves, et l'on distingue ainsi les accès sévères des accès simples.

Les accès palustres simples se traduisent par une température corporelle élevée ($>37,5^{\circ}\text{C}$) associée à la présence de parasites dans le sang et à des manifestations cliniques non pathognomoniques (maux de tête, nausées, diarrhées, convulsions). Ces accès sont provoqués par la lyse massive et synchrone des globules rouges infectés, et l'on suppose que les antigènes libérés lors de la rupture des globules rouges stimulent la production de molécules pyrogènes comme le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6 (Kwiatkowski, 1995).

Les liens entre ces différentes manifestations cliniques et parasitologiques sont complexes, et l'on ne sait pas bien quels sont les facteurs favorisant l'évolution vers les formes cliniques sévères de la maladie. Toutefois, il ressort des études épidémiologiques que le risque d'accès augmente avec la charge parasitaire sanguine, mais dépend aussi de l'âge des individus (Rogier et *al.*, 1996), et d'autres facteurs, dont les facteurs environnementaux, les facteurs d'exposition au parasite (nombre de piqûres infestantes/personne/an; nombre de sporozoïtes/piqûre infestante), les facteurs de virulence des souches parasitaires rencontrées (cytoadhérence, sécrétion de toxines pyrogènes, résistance aux traitements anti-paludiques), et les facteurs immunologiques et génétiques liés à l'hôte .

4. Système immunitaire de l'hôte et le parasite :

4.1 Immunité innée :

L'immunité innée représente la première ligne de défense de l'organisme vis-à-vis d'un pathogène (Janeway, Medzhitov et *al.*, 2002). Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) captent, internalisent le pathogène et le dégradent pour ensuite pouvoir présenter les antigènes aux lymphocytes T afin d'initier une réponse immunitaire adaptative. Parallèlement à la phagocytose et à la présentation des particules étrangères, les CPA synthétisent un grand nombre de cytokines et de médiateurs de l'inflammation (Aderem et Underhill, 1999). Le système immunitaire inné doit reconnaître grâce à un petit nombre de récepteurs un grand nombre de pathogène potentiel et faire la différence avec les molécules du soi. L'immunité innée a évolué vers une variété de récepteurs qui reconnaissent des motifs conservés portés par le pathogène et qui sont absents chez les eucaryotes supérieurs. Ces motifs sont généralement importants pour l'invasion ou l'expression du pouvoir pathogène du germe et sont donc très conservés au sein d'une même classe. Janeway et Medzhitov ont proposé de les nommer des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Au cours de l'inflammation, les PAMPs peuvent activer plusieurs mécanismes de l'immunité innée, comme la phagocytose, la synthèse de peptides antimicrobiens et des médiateurs de l'inflammation telles les cytokines et les chemokines.

À cet effet, ce système dispose de PRRs (Pattern-Recognition Receptors) capables de reconnaître et de lier les PAMPs et d'initier l'activation de voies de signalisation cellulaire aboutissant à l'expression de nombreux gènes. Les différents membres des PRRs membranaires peuvent être répartis en deux groupes, ceux qui sont impliqués uniquement dans la phagocytose (récepteur au mannose et scavenger receptor) (Medzhitov, Janeway et *al.*, 2000) (Stahl et Ezekowitz, 1998) et ceux qui sont impliqués à

la fois dans la phagocytose et dans la synthèse de cytokines pro inflammatoires (Toll Like Receptors).

4.1.1 Les récepteurs humains de type Toll (TLRs) :

Actuellement 10 récepteurs de type Toll ont été clonés chez l'homme et ont été nommés TLR1 à TLR10 (Aderem, Ulevitch et *al.*, 2000). Les gènes des récepteurs Toll sont répartis de façon diffuse dans le génome : *TLR1* et *TLR6*: 4p14; *TLR2* et *TLR3*: 4q31.3-q35; *TLR4*: 9q32-q33; *TLR5*: 1q33.3-q42; *TLR7* et *TLR8*: Xp22; *TLR9*: 3p21.3 ; *TLR10*: 4p14.

Les TLRs possèdent une partie transmembranaire qui contient un domaine riche en cystéines. La partie intracellulaire est homologue à celle du récepteur à l'interleukine-1 et est appelée domaine TIR (Toll Interleukine-1 Receptor). Ce domaine TIR a été remarquablement conservé durant l'évolution, et induit une réponse anti-infectieuse aussi bien chez les plantes, les insectes que chez les mammifères. Les TLRs humains diffèrent essentiellement au niveau de leur partie extracellulaire, c'est-à-dire dans la partie du récepteur impliquée dans la reconnaissance spécifique des PAMPs.

4.1.2 Signalisation des récepteurs humains de type Toll :

La stimulation des différents TLRs par leurs ligands respectifs active des voies de signalisation similaires. La mieux caractérisée est la voie de signalisation aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Elle fait intervenir des molécules communes à la voie de signalisation de NF- κ B induite par le récepteur à l'interleukine-1. Après une stimulation, MyD88 (Myeloid differentiation 88).étant une molécule adaptatrice essentielle est recrutée au niveau du domaine TIR et active une cascade de tyrosine phosphorylations impliquant les kinases IRAK/NIK/TAK/IKK β . Au final, I κ B

est phosphorylé puis dégradé, ce qui permet la translocation nucléaire des sous unités p50/p65 de NF- κ B (Muzio, Polentarutti et *al.*, 2000).

De nombreux gènes inductibles de la réponse immunitaire sont contrôlés par NF- κ B et AP-1 [Angel, 1991] [Baldwin, 1996]. En dehors de la voie de signalisation de NF- κ B, les TLRs et les récepteurs à l'interleukine-1 activent la voie des MAPKinases (Mitogen-Activated Protein Kinases). Les MAPKinases sont le point de convergence de nombreux signaux cellulaires initiés à la membrane et activent le facteur transcriptionnel AP-1.

4.1.3 TLRs et Paludisme :

Les cytokines et les médiateurs pro inflammatoires sont importants pour l'élimination du parasite mais aussi contribuent à la pathologie. Les TLRs des cellules mononucléaires jouent un rôle important dans la reconnaissance des structures antigéniques conservées et initient les mécanismes de l'immunité innée de l'hôte. Le GPI par exemple, un antigène de surface des parasites protozoaires a été identifié comme activant la réponse immune innée via le TLR2 de l'hôte. Les résultats de l'analyse de l'expression génétique menée sur des modèles de rongeurs et humains ont permis de corréliser les voies de signalisation des TLRs avec le paludisme (Krishnegowda et *al.*, 2004).

Des études récentes ont également identifié l'hémozoïne comme pouvant provoquer une activation robuste de la réponse immune innée par la production de cytokines pro inflammatoires. Ceci par l'intermédiaire des TLRs (Cevayir et *al.*, 2005). Dans le modèle murin les auteurs démontrent que cet antigène purifié active les cellules immunitaires par l'intermédiaire du TLR9 et dépendant de la MyD88

D'autres études récentes (Sathit et *al.*, 2004) ont montré que les stades sanguins de *P. falciparum* activaient les cellules dendritiques plasmacytoides humaines aussi bien que les cellules dendritiques murines à travers des mécanismes dépendants de la MyD88 et TLR9.

4.2 Immunogénétique de la réponse de l'hôte face au paludisme:

Plusieurs mutations délétères quand elles sont homozygotes, ont été identifiées comme résultant du paludisme. La fréquence élevée de ces mutations dans les zones où le paludisme est endémique est probablement due à leur effet protecteur contre le paludisme sévère. Quelques exemples de ces mutations comme la drépanocytose, la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase, ovalocytose mélanésienne et les thalassémies sont évocateurs. Chacune de ces mutations interfère avec la survie du parasite ou sa capacité à ré infecter des globules rouges. Malheureusement la découverte de ces mutations n'a pas mené au développement de nouveaux traitements ou prophylaxie contre le paludisme. La plupart de ces mutations présentent de sérieuses complications pour l'hôte quand il est homozygote et n'offre aucune application thérapeutique pratique. (R.A burt, 1999)

Le polymorphisme de cinq de ces molécules a été exploré à ce jour : ICAM-1, TNF- α , IL-1 β , iNOS2 (NOS inductible) et CR-1 (récepteur du complément-1). À l'étude de ces cinq gènes candidats, il faut rajouter celles concernant la mannose binding protein (MBP), protéine jouant un rôle dans l'immunité innée, et l'HLA-B53, antigène leucocytaire de classe I.

Le seul résultat clair concerne le TNF- α . Pour les autres polymorphismes, soit aucune association n'est retrouvée (IL-1RA, CR-1, MBP), soit les résultats sont géographiquement hétérogènes (ICAM-1, HLAB53) ou contradictoires (iNOS2).

4.2.1 TNF- α (Tumor necrosis factor alpha):

Dont le gène est localisé dans le locus HLA est un très bon candidat pour l'étude du contrôle génétique du paludisme. Plusieurs auteurs ont en effet détecté une association entre les fortes productions de TNF- α et le neuropaludisme tant chez l'homme que chez les modèles animaux (Grau, et *al.*, 1987.; Grau et *al.*, 1989.; Kwiatkowski et *al.*, 1990), et une étude familiale a mis en évidence un contrôle génétique de la production de TNF- α (Westendorp et *al.*, 1997). Trois polymorphismes ont été identifiés en position -376, -308 et -238 dans la région promotrice du gène de TNF- α et certains de ces polymorphismes sont fonctionnels.

Le TNF- α sécrété par les monocytes activés lors de l'infection par *Plasmodium* agit sur un grand nombre de cellules, et exerce différents rôles dans la réponse immunitaire anti-plasmodiale. Le TNF- α a une action anti-parasitaire directe sur les stades érythrocytaires en inhibant leur croissance *in vitro* et *in vivo* (Orago et *al.*, 1993; Taverne et *al.*, 1987). De plus, le TNF- α favorise l'élimination des mérozoïtes et des stades sanguins par les cellules effectrices en stimulant la phagocytose et la production de radicaux oxygénés (Kumaratilake et *al.*, 1992b; Kumaratilake et *al.*, 1991; Kumaratilake et *al.*, 1990; Kumaratilake et *al.*, 1995; Ockenhouse et *al.*, 1984b; Rockett et *al.*, 1992). De part ses propriétés pyrogènes, le TNF- α peut aussi être impliqué dans l'inhibition de la croissance du parasite provoquée *in vivo* par l'augmentation de la température corporelle (Kwiatkowski, 1989). Le TNF- α stimule en effet l'expression à la surface des cellules endothéliales de molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1 et la E-selectine qui interviennent dans les phénomènes de cytoadhérence du neuropaludisme (Berendt et *al.*, 1989; Grau et *al.*, 1987; Grau et *al.*, 1991; Ockenhouse et *al.*, 1992; Turner et *al.*, 1994). D'autre part, le TNF- α stimule la production de NO par les cellules endothéliales au niveau des microvaisseaux.

4.2.2 Interféron gamma

L'IFN- γ est cytotoxique *in vitro* pour les stades hépatiques (Ferreira et al., 1986; Mellouk et al., 1987) et érythrocytaires (Jacobs et al., 1996). L'action de l'IFN- γ n'est cependant pas toujours directe, mais souvent associée à l'activation de cellules effectrices. Ainsi, *in vitro* l'IFN- γ augmente l'activité anti-parasitaire des monocytes/macrophages (Ockenhouse et al., 1984a) et des neutrophiles (Kumaratilake et al., 1991), en stimulant la phagocytose et la production de molécules cytotoxiques comme le NO (Anstey et al., 1996), les radicaux oxygénés H₂O₂, et le TNF- α . En zone d'endémie, l'IFN- γ est associé à la protection contre la réinfection (Luty et al., 1999), ou à une diminution de l'infection (Ferreira et al., 1986; Herrera et al., 1992), alors que dans d'autres études, la production d'IFN- γ par les cellules mononuclées *in vitro*, est associée à une augmentation du risque d'accès palustres simples (Riley et al., 1991b). De plus, dans un modèle murin d'infection par *P. berghei* ANKA, l'IFN- γ a été impliqué dans le neuropaludisme (Grau et al., 1989).

4.2.3 Génétique du contrôle des parasitemies sanguines :

Des analyses de ségrégation des niveaux d'infection sanguins ont été menées dans 2 populations au Cameroun. Abel et al, en 1992 examinaient 42 familles camerounaises venant d'une ville nommée Edéa sur une période de 2ans et demi. Durant ce temps 10 échantillons de sang ont été prélevés par participant et les densités parasitaires ont été déterminées. Les résultats suggèrent qu'un gène majeur récessif serait responsable du contrôle de la densité parasitaire. La fréquence du gène a été estimée à 0,44 -0,48 et 23% de la population est prédisposée à un haut niveau d'infection.

En résumé les processus conduisant à la pathogenèse sont mal connus. Il est admis qu'une charge parasitaire sanguine élevée est un facteur de risque pour la survenue des accès simples et sévères. Ainsi, en contrôlant la charge sanguine, certains gènes pourraient jouer un rôle dans la protection clinique. Ces gènes sont donc des candidats intéressants pour l'analyse du contrôle génétique des accès simples et sévères. Ces gènes pourraient contrôler efficacement la parasitémie en induisant une forte réponse anti parasitaire mais en contre partie, il est possible qu'une telle réponse puisse favoriser la pathogenèse. Les cytokines pro inflammatoires telles que TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-1 et l'oxyde nitrique produit durant l'infection palustre sont critiques pour le contrôle du développement du parasite. Cependant, une production excessive de cytokines peut aboutir à des sévères conditions pathologiques.

5. Cas spécifique de l'enfant: Acquisition de l'immunité antipalustre

L'expression du paludisme chez l'enfant est sous la dépendance de multiples facteurs conditionnant l'acquisition de l'immunité: les modalités d'exposition au *P. falciparum* de la naissance à l'âge adulte, les facteurs génétiques modulant la vulnérabilité à l'infection palustre et d'autres facteurs d'environnement.

L'acquisition de l'immunité se fait au prix d'une forte morbidité et d'une mortalité élevée. Elle est sous la dépendance étroite du niveau de transmission.

Le support immunologique intime de cette protection n'est pas encore bien connu. On évoque deux types d'immunité:

- Immunité antiparasitaire:

Développée au *prorata* des expositions répétées aux plasmodies, ce qui permettrait aux enfants plus âgés de maintenir leur parasitémie au dessous d'un seuil pyrogène, diminuant ainsi progressivement avec l'âge l'incidence et la durée des accès cliniques. Cette immunité aurait un support cellulaire contrôlé par des lymphocytes T et un support humoral (IgG1 et IgG3).

- Immunité antitoxique:

Elle apparaît rapidement dès les premières infections et qui est à l'origine de la tolérance de la parasitémie, même à des taux très élevés ainsi une association entre l'âge et la densité parasitaire.

6. Méthodes de diagnostic :

6.1 Morphologiques :

Les techniques de la goutte épaisse et du frottis mince sont les méthodes les plus anciennes et toujours utilisées en laboratoire. Elles sont basées sur l'observation directe au microscope de la morphologie des différents parasites.

6.2 Immuno-chromatographiques:

Récemment des méthodes immuno-chromatographiques de diagnostic rapide ont été mises au point. Ce sont des tests basés sur la reconnaissance d'antigènes des parasites par des anticorps monoclonaux conjugués dirigés contre ces antigènes. Le complexe antigène anticorps (et donc la présence du parasite) est révélé par une réaction colorée. Plusieurs tests existent dont le test Optimal-IT™ où l'antigène considéré est la lactate Déshydrogénase (LDH), Parasight F™ et Core™ Malaria Pf basés sur la capture de la protéine Histine rich protein 2 (HRP2).

6.3 Biologie moléculaire :

Le diagnostic peut également être réalisé à l'aide de la technique de la PCR (Polymerase chain reaction). Cette méthode permet en plus d'étudier l'empreinte génétique de cette espèce à condition d'avoir des marqueurs moléculaires.

Les marqueurs sont des gènes à une seule copie dans le génome haploïde du parasite. Ils peuvent être utilisés pour estimer le nombre de parasites circulants dans le sang périphérique, à condition qu'ils soient suffisamment polymorphiques. Les gènes candidats dans ce but doivent être stables durant la phase asexuée du cycle de vie du parasite et avoir une seule copie du gène par génome parasitaire haploïde (Koita., 2000). Cette PCR avec de tels marqueurs est souhaitable pour l'étude de la dynamique de populations parasitaires.

Le diagnostic par la PCR utilise généralement des marqueurs de gènes à copies multiples, dans la plupart des cas ces séquences de gènes doivent être conservées et capables de discriminer les espèces.

Au cours de cette étude nous avons utilisé des marqueurs moléculaires des gènes à une seule copie, Il s'agit des amorces du Bloc 2 du gène MSP-1. En se référant à la séquence du gène de MSP-1 publiée par Miller et *al.*, en 1993. Nous avons utilisé trois paires d'amorces s'hybridant au niveau des régions conservées des blocs 1 à 5. De ce fait, chacun des allotypes est traité avec deux amorces spécifiques, mises au point à partir des séquences de chacune des souches: K1, MAD20 et RO33.

6.3.1 MSP-1 de *P. falciparum*

Ce gène est situé sur le chromosome 9, il code pour une glycoprotéine de 195 kDa qui est synthétisée au cours de la schizogonie érythrocytaire. Le séquençage du gène de la protéine MSP-1 a permis de le diviser en 17

blocs. Grâce à la comparaison des données de séquences provenant de nombreux isolats. Le bloc 1 contenant la séquence signal est hautement conservé. Il est suivi du Bloc 2 qui a 3 répétitions de tri peptides de type S-X-X. En se basant sur ces répétitions 2 formes (allotypes) ont été décrites le K1 (Karnjanaburi-1) et le MAD20 (Madang) allotypes de Thaïlande et de Papouasie nouvelle guinée respectivement (Tanabe *et al.*, 1987). Plus récemment un 3^{ème} bloc 2 allotypique (RO33) a été retrouvé au Ghana (Certa *et al.*, 1987) et en Thaïlande (Peterson *et al.*, 1988b). Une forme hybride entre MAD20 et RO33 a été récemment découverte (Koita, 2000). Les autres blocs 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14, 15, et 17 sont dimorphiques et ils peuvent être des allotypes soit K1 ou MAD20. En revanche les blocs 1, 3, 5, 12 et 17 sont relativement conservés. Le bloc 17 est riche en cystéine et possède une séquence d'ancrage pour la molécule de glycosylphosphatidylinositol (GPI) par lequel la protéine MSP1 est attachée à la membrane du parasite.

Le rôle de cette protéine n'a pas encore été élucidé. Parkins et Rocco en 1998, et Blackman *et al.*, 1991, ont suggéré qu'elle serait impliquée dans le processus d'invasion du globule rouge par le parasite.

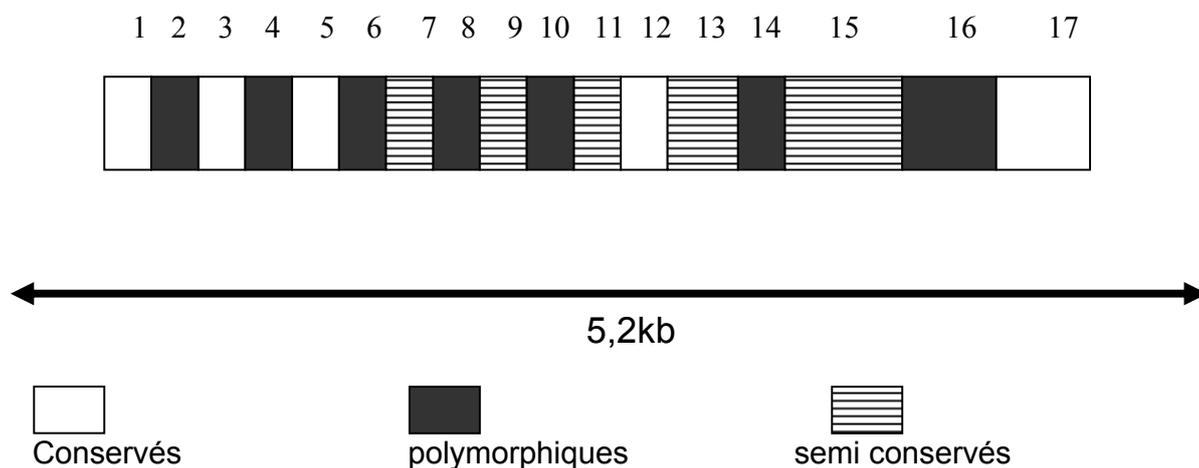


Figure 2 : Structure du gène de la MSP-1

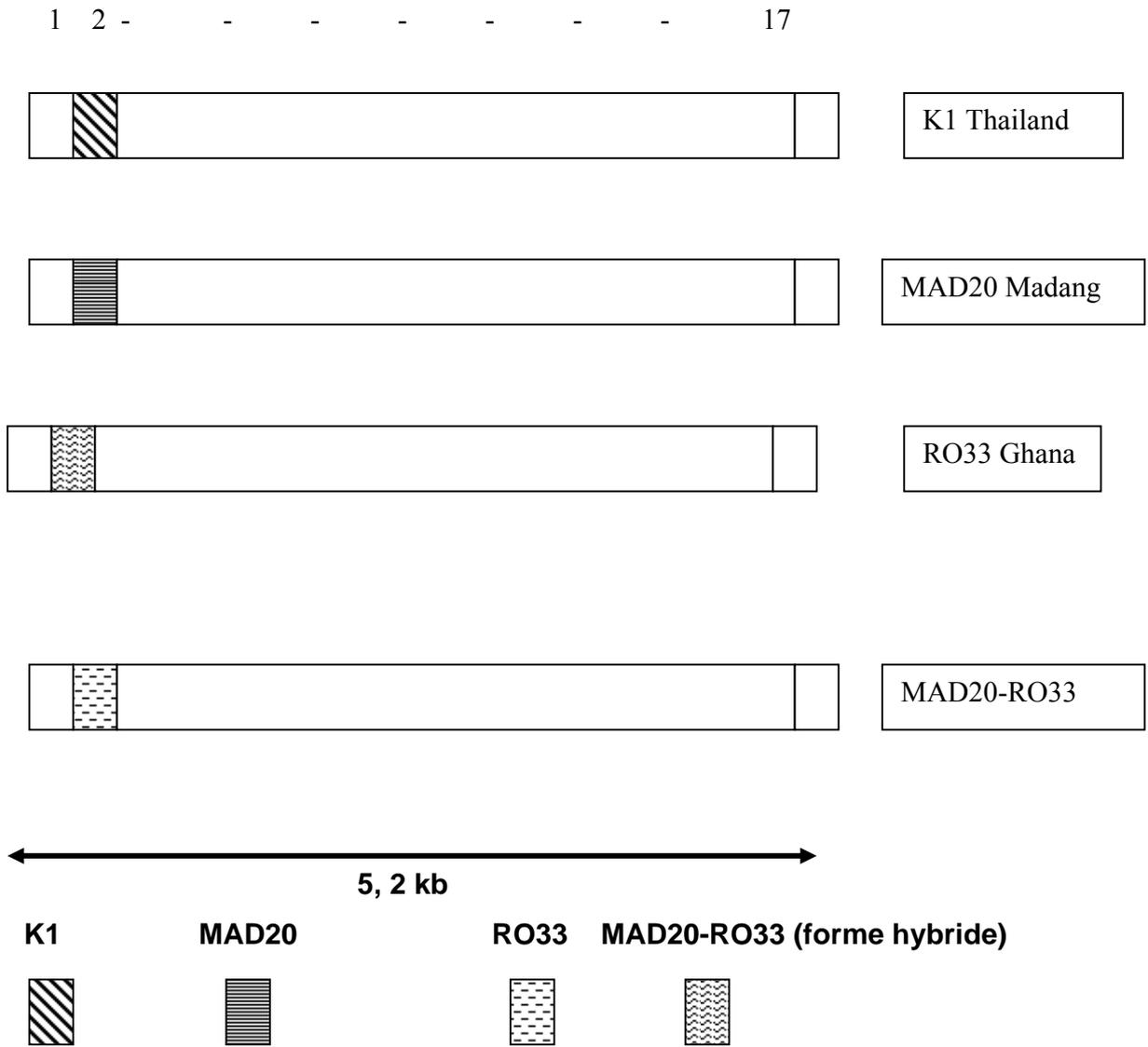


Figure 3 : Structure des trois allotypes du bloc 2 de la MSP-1 plus la forme hybride entre MAD20 et RO33.

6.3.2 La Polymerase Chain Reaction (PCR) ou Réaction de Polymérisation en Chaîne

6.3.2.1 Définition et Principe de la PCR

Mise au point par Kary Mullis en 1985, la PCR est une technique d'amplification génique, c'est à dire qu'elle permet de repérer un fragment d'ADN ou de gène précis, même présent en quantité infime dans un mélange, puis de le multiplier rapidement. Le principe de la PCR est d'utiliser de manière répétitive l'une des propriétés des ADN polymérase: celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce.

6.3.2.2 Les réactifs utilisés

- Les amorces :

Les amorces de la PCR sont des oligonucléotides longs de 18 à 30 nucléotides qui peuvent s'apparier aux séquences complémentaires des matrices d'ADN. Elles s'apparient sur les brins opposés de la séquence cible de sorte qu'ils puissent être allongés les uns vers les autres par addition de nucléotides à partir de leur extrémité-3 (réaction de polymérisation).

- L'enzyme :

Une importante avancée technologique est venue de la découverte d'une bactérie vivant dans les eaux chaudes et ayant une ADN polymérase. Cette enzyme est efficace à des hautes températures. L'espèce *Thermus aquaticus* vit dans l'eau à une température de 72°C. Son ADN polymérase appelé *Taq polymérase* a une température optimale de 72°C et est raisonnablement stable à 94°C. Deux formes de Taq sont disponibles, une native et l'autre obtenue par génie génétique. Les 2 formes de la polymérase portent une activité 5'-3' de polymérisation exonucléasique dépendante mais elles ne disposent pas d'une activité 3'-5' exonucléasique. Un excès d'enzyme peut conduire à des amplifications non spécifiques.

- Les nucléotides :
Ils constituent les briques qui forment le brin d'ADN. Leur concentration varie de 20 à 200 mM. Ce sont des nucléotides triphosphate (dNTPs) qui constituent les bases puriques et pyrimidiques. C'est l'addition un à un de ces nucléotides par la *Taq polymérase* qui aboutit à la copie du fragment d'ADN. Ils doivent être mis en excès dans la réaction de PCR. Ces dinucléotides sont utilisés à une forte concentration 200 µM pour chaque dNTP.
- Le tampon :
Le tampon est essentiel pour la réaction de PCR surtout sa neutralité. Le tampon standard pour la PCR contient 50 mM de KCL, 10 mM de Tris Cl (pH à 8,3).durant l'incubation, le pH de la réaction descend d'une unité produisant une solution tampon dont le pH est de 7,2.
- MgCl₂ comme cofacteur enzymatique :
La présence de cations divalents est critique. Ces ions sont des catalyseurs de la réaction enzymatique. Les ions magnésium (Mg²⁺) sont supérieurs aux ions manganèse et calcium qui sont inefficaces. La concentration de magnésium commence à partir de 1,5 mM mais elle peut être optimisée.

6.3.2.3 Le cycle de la réaction de la PCR :

Une réaction de PCR correspond à une multiplication exponentielle (2^n) cycle comprenant chacun 3 étapes: la dénaturation, l'hybridation, l'élongation.

Tous les réactifs nécessaires à la synthèse sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape.

- La dénaturation:
Elle permet de séparer la molécule d'ADN se trouvant sous forme de double brin en 2 simples brins par la cassure des liaisons d'hydrogène liant les bases A-T et C-G sous l'action de la chaleur à une température de 94°C.

- L'hybridation:

Elle permet l'appariement des amorces aux séquences nucléotidiques complémentaires sur les 2 brins d'ADN séparés lors de la dénaturation. Le temps d'appariement étant environ 30 secondes à une minute ne permet pas aux 2 brins d'ADN de s'apparier favorisant ainsi la formation du complexe ADN Amorce. La température d'appariement (T_h) varie entre 40 à 60°C, est fonction de la température de ramollissement (T_m) ou de fonte dont la formule est la suivante : $T_h = T_m - 25\%T_m$

$$T_m = 16,6 \log \{ [Na] + 0,41(\%G-C) + 81,5[Na] \}$$

%G-C= % en dGTP et en dCTP.

- L'élongation:

Elle permet la synthèse de la nouvelle copie qui est complémentaire à la séquence de la matrice. Cette synthèse commence par l'amorce déjà appariée. Cette synthèse est conduite par l'enzyme Taq Polymérase (thermostable) qui insère les nucléotides G, A, T, et C selon l'ordre dans la séquence cible (matrice). La température est de 72°C, ce qui permet à la Taq polymérase d'ajouter les nucléotides aux amorces hybrides, dans le sens 5' vers 3'.

6.3.3 Q-PCR (Quantitative Polymerase chain Reaction)

Elle est basée sur le même principe que la PCR classique. Cette technique a l'avantage de pouvoir estimer la quantité de l'ADN au cours de l'amplification. Il existe plusieurs méthodes parmi lesquelles la méthode du SYBR[®]Green I, Molecular Beacons[®], Sondes TaqMan[®], Scorpions[™]Probes, Amplifluor[™] Universal Detection System, LUX[™] Fluorogenic Primers....

7. les molécules antipaludiques :

Un antipaludique est un produit naturel ou de synthèse qui est administré par voie orale, parentérale ou rectale à dose respectable permettant de détruire le parasite du paludisme ou de bloquer sa croissance dans le but de guérir ou de prévenir la maladie. Les molécules antipaludiques peuvent être classées :

7.1 Selon leur activité :

7.1.1 Les schizonticides :

Ils sont actifs sur les formes endo érythrocytaires. On peut les distinguer selon leur mode d'action :

- les schizonticides sanguins qui tuent le parasite dans l'hématie ou plasmocides (la chloroquine, l'amodiaquine, la quinine, la méfloquine, l'halofantrine, la sulfadoxine-pyriméthamine, et le proguanil, le quinghaosu et dérivés) ;
- les antimétabolites d'action lente qui inhibent la croissance du parasite en bloquant la division de son noyau et qui sont des plasmodistatiques.

7.1.2 Les gamétocytocides :

Ils sont actifs à la fois sur les gamétocytes et sur les parasites intra hépatiques (formes exo érythrocytaires). Ils ne sont plus utilisés pour obtenir la cure radicale des infections à *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*. Nous pouvons citer: la primaquine, la plamachine et la rhodoquine.

7.2 Selon la structure chimique :

Nous avons différentes classes selon leur structure chimique :

- Les amino-4-quinoléines ont en commun un noyau quinoléique, une chaîne latérale aminée position 4 et un radical. Ils sont composés de la chloroquine, l'hydroxychloroquine, l'amodiaquine, l'amopyrine, la cycloquine.....

- Les méthanolés quinoléines comportent un cycle quinoléine et un radical méthanol (carbinol) en position 4. Il s'agit de la quinine, la Mefloquine et l'halofantrine.
- Les Amino-8-quinoléines composées de la primaquine, la pamaquine, la pentaquine et la plasmogone ;
- Parmi les Biguanides :le Proguanil ;
- Les diaminopyrimidines sont composées de la pyriméthamine et la Triméthoprime.
- Les sulfamides sont composées de la sulfadoxine et la sulfaméthopyridazine.
- Les molécules dérivées de Quinghasou sont l'Arthémeter, l'Artémésinine et l'Artesiane.
- Parmi les antibiotiques nous avons la Doxycycline, la Clindamycine et l'Erythromycine.

7.3 Les associations :

Elles sont administrées simultanément afin de prévenir l'apparition des souches chimiorésistantes en utilisant des dérivés à action synergique et ayant des mécanismes d'actions différents ou complémentaires

Nous avons les associations suivantes :

- Proguanil (200 mg) + chloroquine (100 mg): sous forme de comprimés pelliculés
- Sulfadoxine (500 mg) +Pyriméthamine (25 mg) : disponible sous forme injectable et comprimé quadrisécable
- Sulfadoxine (500 mg) +Pyriméthamine (25 mg) +mefloquine (25 mg) :
- Dapsone (100 mg) + Pyriméthamine (12,5 mg):
- Atovaquone (250 mg), Proguanil (100 mg) :

8. Méthodes utilisées pour l'étude de l'expression génétique :

8.1 Isolation d'ARN total : *récupération du matériel génétique*

De nombreuses sociétés commerciales proposent actuellement des kits pour l'isolation d'ARN à partir du sang périphérique. Néanmoins elles reposent toutes les mêmes principes. Les cellules sont homogénéisées dans un tampon contenant un détergent puissant à haute concentration (SDS ou Sarcosyl), un agent dissociant (chlorure ou thiocyanate de guanidine), une solution tampon (acétate) et un agent réducteur à haute concentration (2-mercaptoéthanol ou DTT). Ce tampon permet d'inhiber les RNases endogènes et de dénaturer les acides nucléiques et enfin dissocier les protéines qui pourraient être fixées. Quelle que soit la technique l'ARN doit être ensuite lavé par de l'acétate de sodium 3M pH 5 et précipité à l'éthanol. (Cf. : Biologie moléculaire et médecine .2^{ème} édition).

8.2 Techniques d'analyse des ARN :

Chez l'homme il existe environ 30000 gènes répartis sur 24 chromosomes. Un gène est un court fragment d'ADN contenant une information spécifiant un produit nécessaire à l'activité cellulaire. Les gènes ubiquitaires qui sont utilisés comme contrôle interne dans le Northern blot, la Real time reverse transcriptase PCR ainsi que par la technologie des microarrays sont des gènes qui s'expriment dans n'importe quel tissu donc n'importe quel type cellulaire. Par exemple le Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est une enzyme catalytique impliquée dans la glycolyse dans le cytoplasme, la fusion membranaire, construction des microtubules, activité phosphotransférase, exportation d'ARN nucléaires, la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN. Cette enzyme est exprimée dans presque tous les tissus à des niveaux élevés.

Les techniques d'analyse actuelles de l'expression génétique les plus utilisées sont :

8.2.1 Nuclease protection assays (NPA):

Il s'agit d'une technique incluant la ribonucléase protection assays (RPAs) et S1 nuclease assays, sont des méthodes très sensibles pour la détection, la quantification des ARNs spécifiques dans une mixture complexe d'ARN cellulaire. Elles sont constituées par une solution d'hybridation de sondes monobrans antisens de petite taille de l'échantillon d'ARN. Après l'hybridation, toutes les sondes non hybridées restantes ainsi que l'échantillon d'ARN sont éliminés par digestion enzymatique avec une mixture de nucléases. Les nucléases sont ensuite inactivées et les hybrides sondes cibles restants sont précipités. Ces produits sont séparés sur gel de polyacrylamide et visualisés par autoradiographie.

8.2.2 Hybridation *in situ*:

On appelle hybridation *in situ* (HIS) l'utilisation de sondes d'acides nucléiques pour mettre en évidence et localiser , dans les cellules ou les tissus , des séquences d'acides nucléiques, complémentaires de la sonde par leurs bases. L'HIS est un outil pour étudier l'expression des gènes. Elle est très proche dans son principe des Southern et des Northern Blots et repose comme eux, sur l'hybridation d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée avec une séquence complémentaire d'acides nucléiques que l'on cherche à identifier et à localiser.

8.2.3 Northern Blot :

Cette technique permet de mesurer les niveaux d'expression relatifs de l'ARN messenger. Il consiste en une isolation de l'ARNm suivie d'une purification. Une électrophorèse sur gel d'agarose est ensuite effectuée suivie d'un transfert physique de l'ARNm sur une membrane de nylon (le blot). Le blot est sondé par hybridation avec un fragment d'ADN provenant du gène à étudier.

8.2.4 Real Time Reverse Transcriptase PCR :

Il s'agit ici d'amplifier des ADNc qui sont en fait les brins d'ARN messenger retranscrit en ADN par une reverse transcriptase. Elle est basée sur le même principe que la PCR classique. Cette technique a l'avantage de pouvoir estimer la quantité de l'ADN au cours de l'amplification. La chimie de Taq Man est l'une des plus utilisées :

- La chimie Taq Man :

Cette chimie permet d'obtenir un signal fluorescent à partir d'une sonde bi marquée et dont l'augmentation de fluorescence est proportionnelle au produit de PCR. Elle est appelée chimie Taq Man (brevet déposé par Hoffmann La Roche) et la sonde est appelée « sonde Taq Man ». Le principe de cette chimie repose sur la fonction exonucléasique 5'→3' de la Taq Polymérase. La sonde est un oligonucléotide spécifique d'un morceau interne à la séquence amplifiée. La sonde est marquée en 5' par un fluorophore appelé 'reporter' et en 3' par un autre type de fluorophore appelé 'quencher'. Le spectre d'émission du reporter chevauche le spectre d'excitation du quencher. L'émission du reporter est atténué ou 'quenché' (éteint) par la proximité du quencher. Si la sonde est dégradée par l'activité exonucléasique de la Taq, les fluorophores ne seront plus reliés entre eux et l'émission du reporter sera augmentée. L'augmentation du signal correspondant à la composante du fluorophore reporter est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR.

Un des avantages des sondes Taq Man, particulièrement pour la quantification réside dans le fait que la fluorescence ne dépend pas seulement de la présence de la séquence cible, mais aussi de l'amplification de la cible. Cependant, à l'instar des sondes molecular beacons[®], les sondes Taq Man[®] doivent être conçues individuellement pour des cibles spécifiques.

8.2.5 La technique de microarrays ou bio puces :

Les microarrays sont une technologie à haut débit qui permet la détection simultanée de milliers de gènes. Son principe est basé sur l'hybridation de paires de bases. Elle nécessite une lourde logistique informatique pour l'analyse des données. C'est également une plate forme centrale pour la génomique fonctionnelle.

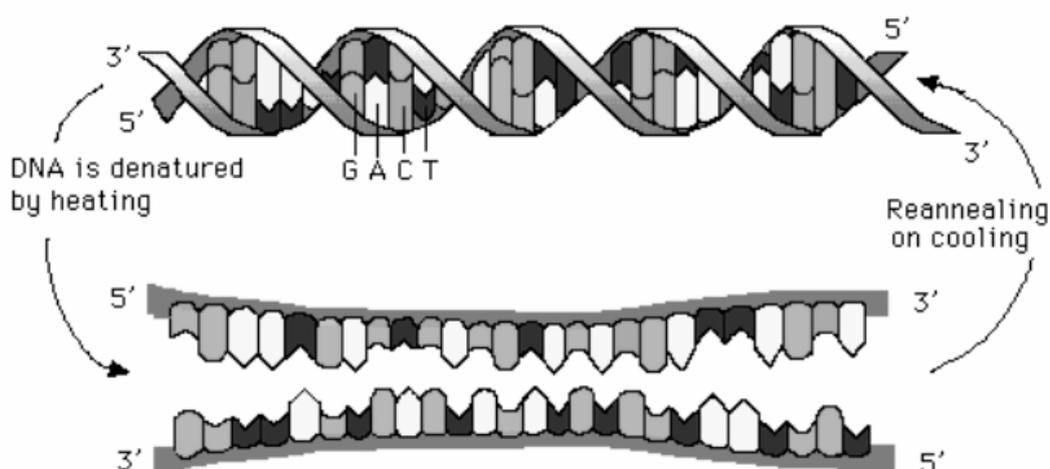


Figure 4 : Dénaturation de l'ADN par la chaleur et appariement par refroidissement. Principe de base de l'hybridation (Tiré de *Introduction to Microarray Technology* par Ken Vernick, Wayne Xu)

- DNA : A-T et G-C
- ARN : A-U et G-C

Cette technologie permet d'avoir une vision d'ensemble sur les processus biologiques complexes. La disponibilité des séquences du génome humain en entier, d'outils informatiques pour l'analyse des données ainsi que l'annotation des séquences d'ADN rendent cette technologie accessible et applicable dans le cadre d'études sur l'expression génétique.

Son principe est le même que celui du Northern blot avec cependant quelques différences majeures :

- il permet de détecter des milliers de gènes simultanément contrairement à la détection individuelle de gènes pour le Northern blot ;
- les sondes sont immobilisées sur la lame de verre et non sur une membrane de nylon ;
- les échantillons cibles sont marqués avec la fluorescence et non par la radioactivité dNTP.
-

8.2.5.1 Principe de fonctionnement :

Comme cité précédemment le principe des microarrays est basé sur la technique d'hybridation. Immobilisés sur un support solide (matrice), des oligonucléotides (simples brins) spécifiques de différents gènes ou ADNc connus constituent les sondes dont le rôle est de détecter des cibles marquées complémentaires, présentes dans le mélange complexe à analyser (ARNm extraits de cellules, tissus ou organismes entiers et convertis en ADNc). Les sondes sont soit greffées sur le support, soit synthétisées *in situ* (unité d'hybridation = plot). Les signaux d'hybridation sont détectés par fluorescence.

8.2.5.2 Méthode de fabrication et *design* des puces :

8.2.5.2.1 Fabrication de la puce :

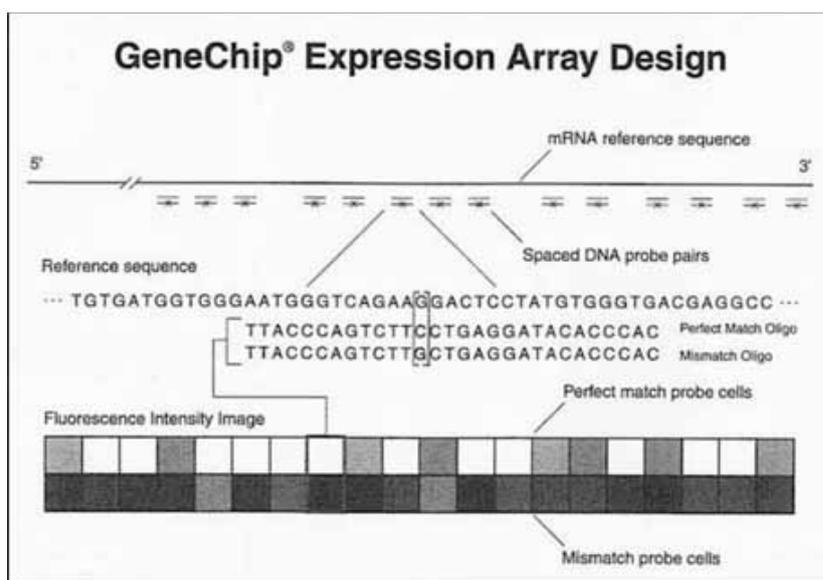
Les sondes sont synthétisées soit *in situ* (sur la puce) ou par synthèse conventionnelle suivie par une fixation sur la puce. Elles sont généralement appelées puces à ADN ou puces à oligonucléotides. Ce type de puce a été développée par Affymetrix sous le nom Gene Chip[®]. A chaque gène correspondent 11 à 20 paires de sondes synthétisées sur la puce.

Chaque paire de sondes possède 2 oligonucléotides :

- Perfect match (PM, séquence de référence) ATG....C....TGC (20- 25 bases);

- Mismatch (MM, changement d'une base) ATG....T.....TGC

Le résultat scanné pour un gène donné est la moyenne des différences entre les signaux de PM et MM, sur toutes les sondes pour le gène.



-Affymetrix MAS5 algorithm

Figure 5: Gene Chip expression Array Design (Source: Affymetrix - Gene Chip® Array Manufacturing.html)

7.2.5.2.2 Synthèse des sondes *in situ* : La méthode photolithographique

Les puces (Gene Chip® probe arrays) sont fabriquées en utilisant une technologie qui combine la chimie photolithographique et combinatoire. Des dizaines de milliers d'oligonucléotides différents sont synthétisés sur chaque collection (array). Chaque oligonucléotide est localisé dans une aire spécifique de la collection appelée cellule de sondes (Probe cell). Chaque cellule de sondes contient des millions de copies de l'oligonucléotide donné.

Les collections de sondes sont fabriquées pendant une série de cycles. Le substrat de verre est initialement enduit avec des molécules fixatrices (linkers) contenant des groupes photolabiles protecteurs. Le masque est

appliqué de façon à exposer des portions sélectionnées de la collection à la lumière ultra violette. L'illumination élimine les groupes photolabiles protecteurs permettant l'addition sélective de nucléoside phosphoramidite seulement au niveau des sites qui ont été exposés prévisionnellement. Différents masques sont ensuite appliqués, le cycle de l'illumination ainsi que le couplage chimique sont effectués à chaque fois. Par répétition de ce cycle, des ensembles spécifiques de sondes oligonucléotides sont synthétisés avec chaque type de sonde dans une localisation connue. La collection de sondes (Probe array) une fois complète est emballée dans des cartouches.

L'échantillon d'ARN est marqué par la biotine et hybridé à la puce. La sonde hybridée à l'échantillon est rendue fluorescente par la fixation de la streptavidine-phycoérythrine (fluorochrome devenant fluorescent lorsqu'il est excité par un faisceau lumineux). La quantité de lumière émise à 570nm est proportionnelle à la fixation de la cible à chaque localisation de la collection de sondes. Le rôle de chaque sonde est de reconnaître, dans le mélange appliqué à la surface de la biopuce, une séquence cible. La phase d'hybridation est réalisée dans une sorte d'incubateur (station fluidique) et suivie d'un lavage destiné à débarrasser la puce des cibles nucléiques non hybridées.

La détection des hybridations consiste à repérer les adresses des sondes qui sont complémentaires des cibles de l'échantillon à tester. Une lecture optique effectuée par un scanner (GeneChip®Scanner 3000 ou le GeneArray®Scanner) permet de révéler les sondes devenues fluorescentes (hybridées avec les cibles marquées). Les données récoltées sont analysées par un logiciel traitement d'images.

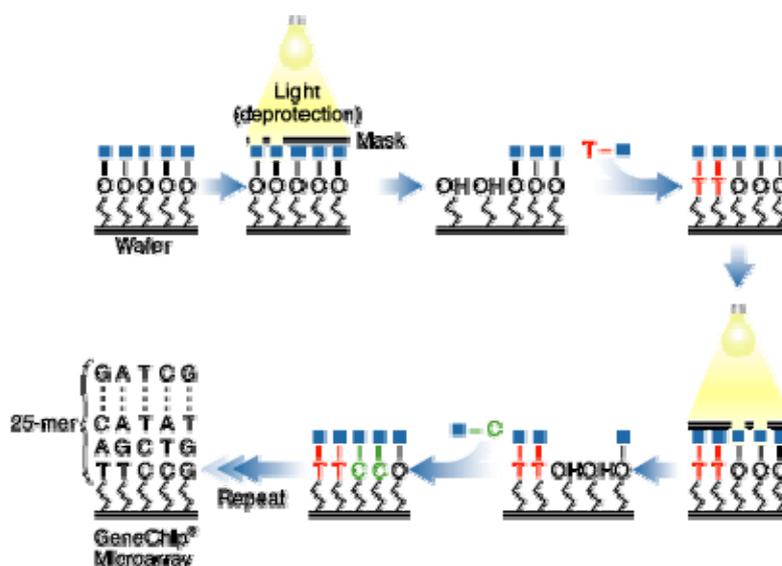


Figure 6: Procédé de la méthode de fabrication photolithographique des sondes. (Source : Affymetrix - GeneChip® Array Manufacturing)

8.2.5.2.3 Les domaines d'utilisation :

Les puces à ADN permettent des tests plus rapides, plus sensibles et plus spécifiques. En évitant certaines étapes préliminaires telle que la culture, elles permettent d'obtenir un résultat en quelques heures là où plusieurs jours étaient nécessaires. Elles peuvent être appliquées dans plusieurs domaines tels : que la pharmacogénomique, l'analyse des mutations, le séquençage par hybridation, le diagnostic des maladies génétiques, le diagnostic des maladies infectieuses, la toxicogénomique, l'agroalimentaire, l'environnement ...

9. Aspects spécifiques et challenges :

Les microarrays malgré leur puissance d'analyse présentent quelques contraintes. En effet, il existe une forte relation entre la qualité de l'ARN ainsi que le niveau de variation interindividuelle élevé dans le transcriptome et le nombre élevé des faux positifs et résultats négatifs fournis par cette technique qui produit jusqu'à 1000000 hybridations sur une seule puce. En outre les études antérieures menées sur le sujet, utilisant la technique des microarrays ont eu l'avantage de bénéficier de conditions de laboratoires optimales aussi bien que la possibilité de tester plusieurs replicats. Ce qui n'est pas le cas dans cette étude.

9.1 Le matériel biologique : *L'ARN*

La qualité et l'intégrité des ARNs sont une donnée primordiale pour la réussite d'étude de l'expression génétique. Les ARNs présentent les particularités suivantes :

➤ Une grande vulnérabilité :

Les ARNs sont sensibles aux RNAses qui sont des enzymes ubiquitaires difficiles à inactiver complètement. Ces enzymes sont très présentes dans le milieu ambiant (les doigts par exemple sont couverts de RNase A). Ces enzymes sont extrêmement actives et très résistantes à tous les traitements qui sont généralement néfastes pour toutes les autres enzymes.

➤ Une grande complexité :

Les ARNs messagers qui constituent le transcriptome présentent pour la plupart une spécialisation cellulaire stricte et sont en très faible quantité. Par exemple le messager de la phénylalanine hydroxylase ne sera présent que dans l'hépatocyte, celui de la thyroglobuline dans la glande thyroïde. Par conséquent le tissu à extraire doit être choisi avec minutie, compte

tenu de l'expression variable en fonction de la différenciation (sauf pour les gènes dits domestiques parce qu'ils ont une expression ubiquitaire).

➤ Une grande instabilité de l'ARN :

Un autre élément majeur est la stabilité de l'ARN: La plupart des procédures d'isolation d'ARN ne donnent des résultats de qualité optimale que si l'ARN est isolé immédiatement après le prélèvement à une température maximale de 23°C, en plus elle nécessite des mesures d'aseptie rigoureuses difficiles à reproduire sur le terrain. L'isolation immédiate de l'ARN sur le site de prélèvement n'est pourtant pas possible et la température ambiante sur le site de collection des échantillons est souvent $\geq 40^\circ\text{C}$. En outre même une fois extraite, l'ARN demeure extrêmement instable

9.2 La cible cellulaire :

La population cellulaire ciblée lors de cette étude est constituée par les cellules mononucléaires (lymphocytes et les monocytes). Lors de l'isolation de cette fraction leucocytaire il est possible que des cellules polynucléaires et/ou des réticulocytes contaminent l'échantillon. L'ARN total isolé à partir de tels échantillons contient entre autre de l'ARN codant pour l'hémoglobine et l'ARN codant pour beaucoup d'autres protéines pas nécessairement impliquées dans les mécanismes de défense de l'organisme.

Cela favorise la formation d'artefacts et constitue une source d'erreurs potentielles dans l'analyse et l'exploitation des données de microarrays.

9.3 Le coût élevé de la technique du Microarray :

L'analyse d'un seul échantillon par la société Affymetrix® coûte environ 600 U\$, l'envoi d'échantillons dégradés conduit à des résultats inexploitable mais facturés.

MATERIELS ET METHODES

1. DEMARCHE METHODOLOGIQUE :

Le sang périphérique a été choisi parce qu'il est l'unique tissu accessible qui permet d'examiner les variations de l'expression génétique chez des individus symptomatiques ou non. Il constitue une source accessible de cellules dont l'investigation peut permettre de répondre à certaines questions. Les leucocytes circulants peuvent être examinés, car maintenus dans un état perpétuel de vigilance et de surveillance du corps face à des signes d'infections ou autres déficiences. L'analyse de la réponse des leucocytes circulants en terme d'expression génétique peut potentiellement fournir des signaux d'alertes de l'organisme en réponse au paludisme.

Cependant les données fournies par les microarrays peuvent être influencées par plusieurs facteurs dont:

Les contraintes :

- Les risques de confusions potentielles : liés aux différences entre les individus (l'ADN génomique de chaque individu est unique, de ce fait l'expression génétique sera donc spécifique : deux échantillons provenant d'individus différents ne pourront pas être comparés) ;
- La difficulté d'identifier des gènes contrôles avec une expression stable équivalents à ceux utilisés dans le Northern blot et la PCR en temps réel. De tels gènes sont des éléments de contrôle endogène dont les expressions ne doivent pas varier pour un même individu ;
- Les faux positifs (artéfacts) : inévitablement produit par les microarrays qui effectuent plus de 1000000 d'hybridations simultanément sur une seule puce.

Importance de la démarche méthodologique:

Le design expérimental adopté pour cette étude permet d'éviter les facteurs de confusions :

➤ Variations interindividuelles:

Une série de trois prélèvements sanguins a été effectuée sur le même individu. Le patient est de ce fait considéré comme son propre contrôle, évitant ainsi les variations entre les individus dûes aux différences dans les ADN génomiques.

Le 1^{er} prélèvement au moment du diagnostic initial (A) suivi d'un deuxième prélèvement le 3^{ème} jour après un traitement antipalustre (B) et le dernier prélèvement effectué le 10^{ème} jour après le suivi du traitement (C).

➤ Identification de gènes contrôles avec une expression stable:

Les gènes contrôles choisis sont ceux du cytosquelette (*β-actine* et *GAPDH*). Ces gènes sont nécessaires à la survie de la cellule. Ils ont par conséquent une expression stable qui n'est pas liée à l'état physiologique ou pathologique des patients. Ils codent tous les deux pour des protéines ubiquitaires du cytosquelette. Cependant les niveaux d'expression du GAPDH varient sensiblement entre les individus (Bustin et al., 1999).

➤ Usage de puces à oligonucléotides en duplex pour chaque échantillon :

Deux puces à oligonucléotides sont utilisées pour chaque échantillon. Les données fournies par les deux puces doivent être identiques pour un même échantillon, dans le cas échéant l'échantillon est automatiquement rejeté.

➤ Les faux positifs des données de Microarrays:

Les échantillons positifs sont réexaminés et validés par la technique de la Real Time *reverse transcriptase* PCR en utilisant les sondes Taq Man®.

2. MATERIELS ET METHODES:

2.1 Cadre et lieu d'étude :

Notre étude a été effectuée Centre de Santé communautaire de Banconi dans la commune I du District de Bamako. Banconi est un quartier urbain où résident principalement des personnes qui viennent à la recherche de travail pendant la saison sèche. Le quartier est considéré comme zone péri urbaine. La population d'environ 100.000 habitants (d'après le recensement de 2001) est très pauvre. Elle est également jeune 91% à moins de 45 ans et 65,6% à moins de 25 ans. Le quartier de Banconi couvre une superficie de 280 hectares. Soit une densité très élevée de 357 habitants à l'hectare. Le centre de santé ASACOBA est situé au cœur du quartier de Banconi, dans le secteur de Flabougou en face du goudron principal du quartier. Les consultations médicales effectuées dans le centre étaient de 32096 en 2003 (rapport ASACOBA 2004).

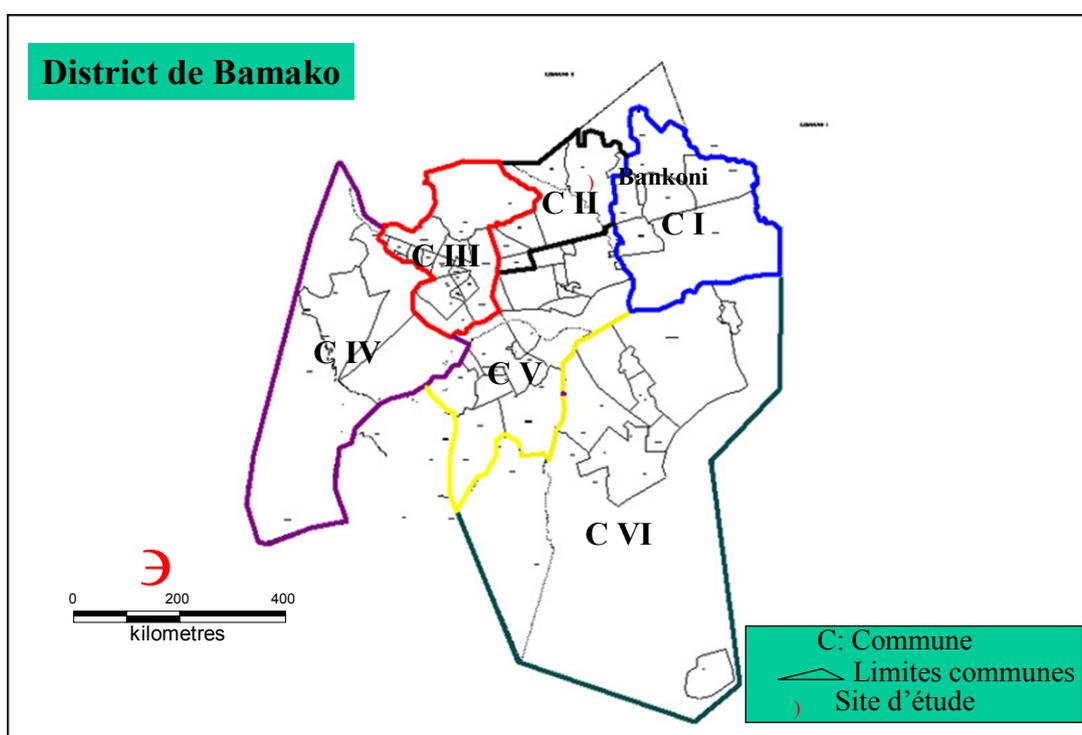


Figure 7 : carte du District de Bamako

Source : GIS/RS du MRTC/FMPOS

2.2 Population d'étude :

Notre population d'étude était constituée des patients venant en consultation à l'ASACOPA de Banconi. Nous avons retenu les critères de sélection suivants :

2.2.1 Critères d'inclusion :

- Age compris entre 6 mois et 15 ans ;
- Symptômes cliniques spécifiques du paludisme ;
- Goutte épaisse positive ;
- Mono infection à *P. falciparum* ;
- Consentement éclairé des parents ou de l'accompagnant de l'enfant.

2.2.2 Critères non inclusion:

- Les nourrissons de moins de 6 mois et les enfants de plus de 15 ans ;
- L'absence de symptômes cliniques ou présence d'autres symptômes cliniques évoquant une autre pathologie;
- Une goutte épaisse négative ;
- La présence d'espèces différentes de *P. falciparum* ;
- Les cas de neuropaludisme ou une altération sévère de l'état général ;
- Le refus volontaire de l'enfant, des parents ou de l'accompagnant.

2.2.3 Considérations éthiques :

- L'anonymat des patients a été protégé par un numéro d'identification ;
- Les frais d'ordonnances de tous les enfants inclus dans l'étude ont été pris en charge à 100% et nous avons également veiller à l'administration effective de ces médicaments avec un suivi du traitement (surveillance clinique de l'état général du patient et contrôle de la parasitémie à chaque visite).

2.3 Période d'étude :

Notre étude s'est déroulée en Août et Décembre 2004. Cette période correspond à la saison des pluies. C'est également une période de forte transmission du paludisme.

2.4 Echantillonnage :

Six enfants ont été retenus dans le cadre de cette étude pilote. Une série de trois prélèvements a été effectuée pour chaque patient. Le premier prélèvement a été effectué au moment où les enfants présentaient les symptômes du paludisme (A), suivi du second au 3^{ème} jour après le traitement antipalustre (B). Le troisième et dernier prélèvement a été effectué le dixième jour après le traitement antipalustre (C) quand tous les symptômes cliniques avaient disparus et que la goutte épaisse était redevenue négative. Au total 18 échantillons ont été collectionnés.

2.5 Organisation du travail :

Cette étude a sollicité l'intervention de 3 centres à savoir :

- Le centre de Santé Communautaire de Banconi (ASACOBA) pour l'identification des patients et le prélèvement des échantillons sanguins (cellules mononuclées) ;
- Le laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée (LBMA) à la FAST pour l'isolation, la vérification de l'intégrité et la pureté ainsi que la stabilisation des molécules d'ARN et la caractérisation moléculaire des souches de *Plasmodium falciparum* par PCR ;
- Le centre de thérapie génique et des maladies infectieuses, Département de Médecine Tropicale, Médecine et Biochimie, Université de Tulane, New puges, LA pour la technique de Microarray.

2.6 Techniques de l'étude :

2.6.1 Identification des patients parasités par *P.falciparum* :

2.6.1.1 La Clinique :

Les paramètres cliniques ont été déterminés au centre de santé ASACOBÀ de Banconi. La fièvre a été évaluée à l'aide d'un thermomètre placé dans le creux axillaire du malade pendant 5 à 7 minutes. Toute mesure dépassant 37°5 C après ajustement (par addition de 0°,5 C) a été considérée comme fébrile. Les examens complémentaires ont été demandés après la consultation pour confirmer ou infirmer la suspicion de paludisme. La présence des autres signes cliniques (fièvre, vomissements...) a été mentionnée sur le bulletin d'analyse adressé au laboratoire du centre de santé. Le traitement a été instauré par les cliniciens du centre de santé.

Pour les patients retenus la vérification d'une amélioration de l'état général (examen clinique) ainsi qu'une vérification de la baisse de la parasitémie a été effectuée à chaque visite après le traitement antipalustre.

2.6.1.2 Examens complémentaires :

2.6.1.2.1 La goutte épaisse :

Elle permet la mise en évidence et la quantification de la densité parasitaire. Une goutte de sang est déposée sur une lame porte objet (VWR Scientific, Chester, PA). A l'aide du bord angulaire d'une seconde lame, la goutte de sang est uniformément étalée en une zone circulaire de 1,5 cm afin d'obtenir une défibrination totale. Séchée à l'air libre, la lame est colorée dans une solution de Giemsa 3% préparée avec une solution tamponnée à pH 7,2. Cette technique permet d'éliminer l'hémoglobine et la coloration des éléments figurés du sang aussi bien que les parasites. Le temps de coloration est de 30 minutes. La lecture de la goutte épaisse a été effectuée à l'aide d'un microscope optique 100X (Nikon Model Eclipse E400, Japon).

L'estimation de la parasitémie a été faite selon la formule suivante (Payne et *al.*, 1989).

Parasitémie/mm³ = Nombre de parasites comptés /300 GB X 25

La densité parasitaire a été estimée en déterminant le nombre de parasites pour 300 globules blancs. Ce nombre est rapporté pour 7500 globules blancs.

Une lame est déclarée négative après l'examen d'au moins 100 champs.

La goutte épaisse est une technique de choix du fait de sa grande sensibilité.

2.6.1.2.2 Le Frottis mince :

Il consiste en la réalisation d'un étalement monocellulaire des éléments sanguins sur une lame porte objet. Il s'agit de déposer une petite goutte de sang capillaire ou prélevée sur anticoagulant à l'extrémité d'une lame. Avec la deuxième lame tenue à 45 degré par rapport à la première, toucher la goutte de sang puis l'étaler d'un mouvement bref sur la première lame pour obtenir un étalement fin. Sécher aussitôt en agitant la lame. Le frottis doit être effectué avec soin de manière à ne comporter qu'une couche cellulaire.

Le frottis est fixé avec du méthanol pendant 30 secondes et coloré avec une solution de Giemsa à 5% pendant 25 à 30 minutes. Rincer et sécher les frottis à l'air libre, puis lire à l'objectif 100X à l'huile d'immersion. Cette technique n'est pas préconisée pour l'évaluation quantitative de la parasitémie, par contre elle est très pratique dans la détermination des espèces.

2.6.1.2.3 Identification moléculaire des parasites de *P. falciparum* par PCR

2.6.1.2.3.1 Le confetti :

Quelques gouttes de sang (50 μ l) ont été utilisées pour la confection de chacun des 5 spots sur le filtre de papier (Schleider & Schuell, Keene, NH, USA) pour chaque enfant. Chaque filtre de papier a été clairement identifié pour chaque patient. Les confettis ont été séchés dans un carton à l'abri des mouches et de la poussière.

Une fois acheminés au Laboratoire la conservation des confettis se faisait dans un dessiccateur en présence de silicagel afin d'empêcher la prolifération des champignons favorisée par l'humidité.

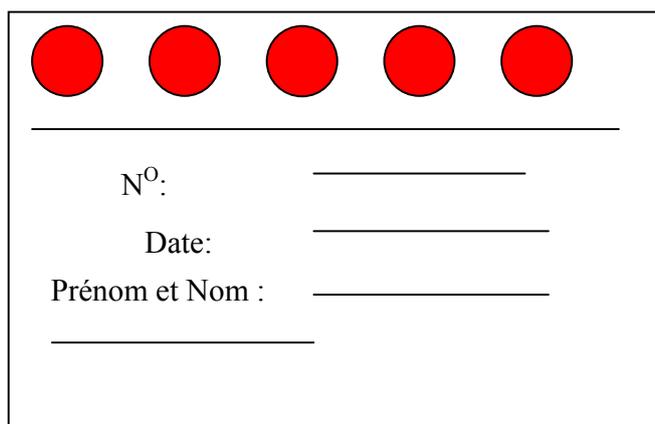


Figure 8: Papier filtre avec des cercles. Les gouttes de sang sont déposées au niveau des cercles

2.6.1.2.3.2 Protocole d'extraction d'ADN génomique:

Nous avons utilisé le Kit QIAamp[®] DNA Mini (QIAGEN, Valencia, CA) pour extraire l'ADN génomique à partir des confettis séchés conformément aux instructions du fabricant. (Voir annexe 1)

2.6.1.2.3.3 Nested PCR (PCR nichée) :

- Amorces utilisées :

Nous avons utilisé la technique de la PCR nichée (Nested PCR) afin d'augmenter la sensibilité de la technique surtout dans les situations de faibles parasitémies consécutives à un traitement antipalustre. Pour cela, une paire d'amorces universelles (MSP-1), non polymorphiques et s'hybridant au niveau des blocs 1 et 5 a été mise au point (Koita., 2000). Le substrat de la première amplification de la MSP-1 a servi de matrice pour allotyper les souches. Ces différentes amorces ont été mises au point à l'aide du programme sur micro-ordinateur DNASIS version 2.6, Hitachi, CA (Koita., 1994).

Tableau I : Séquence des amorces utilisées

Amorces	Séquences	Taille du produit amplifié (pb)
MSP-1-5 5'	5'-TAGAAGATGCAGTATTGACAGGTTA-3'	200 et 500
MSP-1-5 3'	5-ATTCTAATTCAAGTGGATCAGTAAATAA-3'	
K1-5'	5'-CTTAAATGAAGAAGAAATTACAAAAGGTGC-3'	140-266
K1-3'	5'-GAGGGCTTGCACCAGATGAAGT-3'	
MAD20-5'	5'-GTATTAAATGAAGGAACAAGTGGAACAG-3'	157-193
MAD20-3'	5'-TATCTGAAGGATTTGTACGTCTTGAATT-3'	
RO33-5'	5'-AATAAAGGATGGAGCAAATACTCAAGTTGT-3'	153
RO 33-3'	5'-TCTGAAGGATTTGCAGCACCTGGAGA-3'	

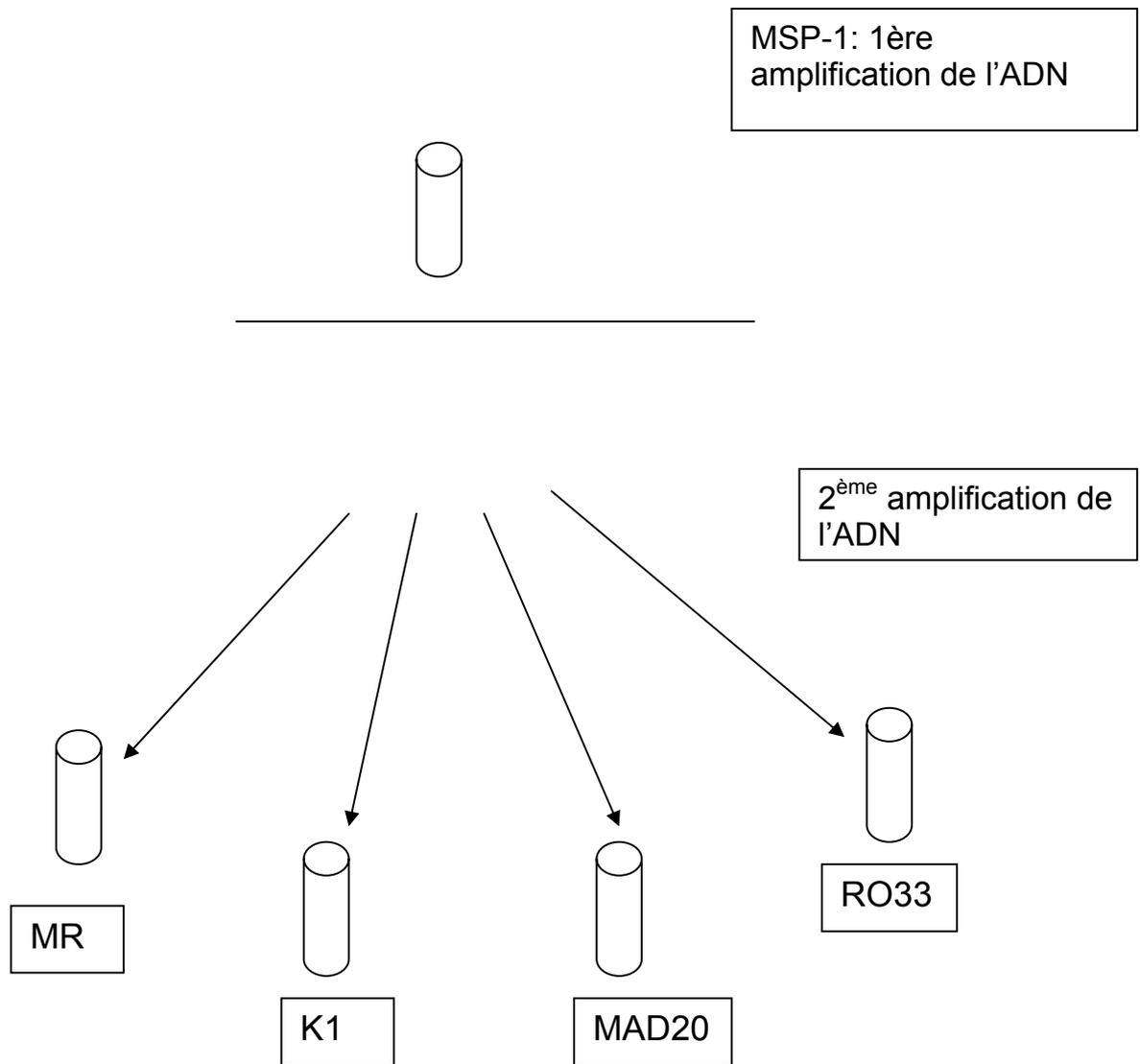


Figure 9: Schéma de la PCR nichée

Légende : Ce schéma indique qu'une 1^{ère} amplification est conduite avec des amorces de séquences conservées au niveau des blocs 1 et 5, générant des fragments d'ADN qui sont ensuite amplifiés par les amorces spécifiques pour les allotypes hybrides MAD20-RO33 (MR); K1, MAD20 et RO33 au niveau du bloc 2.

- Réaction d'amplification des blocs 1 et 5 du gène de la protéine MSP-1 :

Concentrations des réactifs pour la PCR :

Cette amplification initiale permet de générer des fragments entre 200 et 500 Pb qui seront ensuite utilisés pour une seconde amplification avec les amorces spécifiques K1, MAD20 et RO33.

Tableau II: Composition du mélange réactionnel 1(MIXTE1)

Conc. Initiale	Réactifs	Volumes	Conc. Finale
-----	Eau stérile	19,5 µl
10 X	Tampon PCR	3 µl	1X
50 mM	MgCl ₂	2 µl	2 mM
10 mM	Dinucléotide phosphate	4 µl	0,2 mM
50 µM	Amorces 5'	1 µl	1 µM
50 µM	Amorce 3'	1 µl	1 µM

30,5 µl

Le volume de ce mélange est de 30,5 µl dans chaque tube, auquel sera ajouté une bille de paraffine. La bille de paraffine a pour rôle de séparer les amorces de la Taq Polymérase et l'ADN afin d'empêcher les amplifications prématurées. Elle permet également d'éviter l'évaporation de la solution réactionnelle au cours de l'amplification.

Tableau III: Composition du mélange réactionnel 2 (MIXTE 2)

Con. Initiale	Réactifs	Volume	Con. Finale
-----	Eau stérile	15 µl	-----
10 X	Tampon PCR	2 µl	1 X
5 U	Taq polymérase	0.5 µl	0,05 U
-----	ADN	2 µl	-----

19,5 µl

Le volume réactionnel final composé des 30,5 µl du mixte 1 plus 19,5 µl du mixte 2 sera soumis au programme d'amplification suivant :

Une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C suivie de 35 cycles de:

- dénaturation pendant 30 secondes à 94°C,
- appariement pendant 30 secondes à 55°C,
- extension pendant 1 minute à 72°C.

- Etapes de l'amplification du bloc 2 par la PCR :

Elle consiste à amplifier le produit obtenu durant la première amplification par les amorces spécifiques pour K1, MAD20 et RO33. Ainsi 2 µl de l'amplifié est ajouté au mélange réactionnel final (Mixte 1 et Mixte 2).

Une dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C suivie de 35 cycles de:

- dénaturation pendant 30 secondes à 94°C,
- appariement pendant 30 secondes à 57°C,
- extension pendant 1 minute à 72°C.

- Electrophorèse des produits amplifiés par PCR :

Les produits amplifiés ont été logés dans les puits du gel d'agarose à 2% (ultra pure, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) en présence du marqueur moléculaire VI (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). La présence d'une bande sur le gel d'agarose traduit la présence d'un allotype de *P. falciparum*. La présence de plus d'une bande pour un même échantillon signifie que la personne est infectée par plus d'un parasite.

Les bandes identifiées pour chaque paire d'amorces ont été ensuite enregistrées dans le tableur Excel sur Windows 2003. Le programme Kodak 1D version 3.5.4 nous a permis d'estimer la taille de chacun des produits amplifiés afin de mettre en évidence le polymorphisme de la taille au niveau des différents allotypes.

2.6.2 Récupération des cellules mononucléaires à partir du sang total :

Dans le cadre de notre étude nous avons eu à tester trois méthodes de lymphoséparation à partir du sang total au LBMA avant d'aller sur le site de Banconi. Ceci dans le but de définir la technique la plus appropriée pour obtenir des cellules mononucléaires de qualité optimale en vue de l'isolation d'ARN total. Les donneurs étaient des individus sains et asymptomatiques. Les méthodes testées étaient :

2.6.2.1 BD Vacutainer™ Lithium Heparin (Becton Dickinson):

Cette méthode consiste en une centrifugation simple d'un prélèvement de sang total sur tube avec anticoagulant. Cela permet de séparer les globules rouges en culot, un anneau leucocytaire et un plasma cellulaire riche en plaquettes. La fraction leucocytaire est récupérée après élimination du plasma par aspiration.

2.6.2.2 Lymphocyte Separation Medium (Mediatech, INC) : LSM

Le LSM est une méthode d'isolation des cellules mononuclées utilisant la technique de centrifugation dans laquelle le sang dilué et défibriné. IL est ensuite déposé en couche sur une solution de Métrizoate de sodium et de Dextran ou de Ficoll® et centrifugé à 3900 rpm pendant 30 minutes. La migration différentielle qui suit la centrifugation aboutit à la formation de plusieurs couches cellulaires. Les cellules mononuclées (lymphocytes et monocytes) et les plaquettes seront contenues dans la bande située à l'interphase plasma –LSM à cause de leur densité. La couche formée en bas contient la plupart des érythrocytes et granulocytes qui ont migré à travers le gradient au fond du tube. Les cellules mononuclées sont récupérées après aspiration de la couche de plasma. L'excès de plaquettes, de LSM et de plasma peut être enlevé lors du lavage des cellules.

2.6.2.3 Le BD Vacutainer[®] CPT[™] Cell Preparation Tube (Becton Dickinson) :

Il s'agit d'un système de tube de collection contenant de l'anticoagulant (0,1 M de citrate de sodium), un gel thioxotrophique (séparateur) et du Ficoll[®] Hypaque en solution. La densité relativement basse des cellules mononuclées est utilisée pour les isoler du sang total. La séparation se produit pendant la centrifugation quand le gel bouge pour former une barrière qui sépare les cellules mononuclées et le plasma situé dans la partie supérieure des autres composants de plus forte densité qui ont migré au fond du tube .

Au terme de cette optimisation (Voir partie résultats) avec les différentes méthodes, la méthode utilisant les tubes BD vacutainer CPT[™] a été adoptée.

L'isolation des cellules mononuclées de tous les échantillons prélevés a été effectuée selon la procédure suivante :

- a. Le BD Vacutainer[®] CPT[™] Tube avec citrate de sodium a été conservé à la température ambiante (18-25°C) et clairement identifié pour chaque patient ;
- b. Le sang collecté a été ensuite transféré grâce une seringue sur le tube. Celui-ci était bien mixé par inversion légère pour homogénéiser le mélange sang-anticoagulant ;
- c. Le tube (échantillon sanguin) a été centrifugé immédiatement à la température ambiante (18-25°C) dans une centrifugeuse (IEC Centra CL2) pendant 20 minutes à 3900rpm ;

- d. Après la centrifugation, le sang total était fractionné. Le tube présentait la configuration suivante : de haut en bas la couche de plasma suivie d'une couche blanchâtre de cellules mononuclées et les plaquettes ; les globules rouges et les cellules polynucléaires se trouvaient au fond du tube avec le gel de polyester au milieu qui sert de séparateur entre les deux milieux
- e. Le maximum de plasma a été ensuite aspiré sans perturber la couche de cellules mononuclées. La couche blanchâtre de cellules mononuclées était ensuite récupérée à l'aide d'une pipette pasteur stérile jetable (Falcon[®]). Cette opération était effectuée immédiatement après la centrifugation pour de meilleurs résultats ;
- f. Les cellules mononucléaires ont été ensuite mixées dans 1,4 ml de la solution de RNA *later*[®] (Ambion[®]) dans un tube (Eppendorf[®]) de 2 ml. Le mixage était effectué de façon à éviter l'introduction de bulles d'air dans l'échantillon. Une fois mixés dans du RNA *later*[®], les échantillons étaient placés à 4°C dans un sac isolant en attente de leur transport au Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée à la FAST.

2.6.3 Isolation d'ARN total : kit RiboPure™-Blood (Ambion)

Le choix de ce kit repose essentiellement sur la présence d'une substance dénommée le RNA *later*® (Ambion®) qui permet de stabiliser les échantillons cellulaires. Ceci constitue un point important de la procédure, les cellules stabilisées peuvent être stockées à la température ambiante pendant plus de 5 jours. Pour des séjours plus longs il est recommandé de les placer à -20°C.

L'isolation de l'ARN total avec ce kit consiste en 3 phases principales :

- La lyse des cellules sanguines par une solution à base de guanidine et une purification initiale de l'ARN par une extraction avec le Phénol/chloroforme ;
- Une purification finale de l'ARN par une extraction en phase solide sur un filtre en fibre de verre ;
- Un traitement à la DNase pour l'élimination de l'ADN génomique résiduel.

Tous échantillons étaient traités avec ce kit conformément aux instructions du fabricant (Voir annexe 2).

2.6.4 Vérification des molécules d'ARN extraites :

Nous avons procédé à une vérification des molécules d'ARN grâce à deux techniques (Electrophorèse et Spectrophotométrie) effectuée au LBMA (Mali) et une technique (analyse du Bioanalyzer 2100 Agilent) à l'Université Tulane (USA).

2.6.4.1 Electrophorèse sur gel d'agarose à 1% :

Nous avons utilisé 10% de la solution d'ARN total extrait soit 10 µl pour un volume total de 100 µl. La technique de l'électrophorèse sur gel d'agarose 1% avec révélation par le bromure d'éthidium (1mg/ml) a été utilisée pour vérifier l'intégrité des molécules d'ARN total

La présence d'ARN intact se traduit par l'apparition sur le gel d'agarose de deux bandes représentant les deux sous unités ribosomales 28S et 18S de taille approximative respective 5,0 kb et 1,9 kb.

Une fois l'électrophorèse effectuée, la révélation de l'ARN rendu fluorescent par le bromure d'éthidium contenu dans le gel a été réalisée sous la lumière Ultra Violette et photographiée grâce à une caméra montée sur une chambre noire (BioDoc-It™ System). La taille des bandes a été estimée grâce au logiciel KODAK 1D version 3.5.4.

2.6.4.2 Spectrophotométrie- UV : Dosage quantitatif et qualitatif de l'ARN total

La solution d'ARN a été quantifiée par analyse spectrophotométrique utilisant la convention que 1 unité d'absorbance à 260 nm est égale à 40 µg par ml. Avant le dosage des échantillons, la cuve de quartz a été lavée avec une solution 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA suivi par un bref lavage avec de l'eau traitée contre les RNases (RNase free water).

La concentration et la pureté de l'ARN ont été déterminées par dilution d'aliquote de la préparation (1 :20) dans du TE (10 mM Tris HCL pH 8, 1 mM EDTA) et l'absorbance est lue par un spectrophotomètre (BIO-RAD) à des longueurs d'ondes de 260 nm et 280 nm. Un blanc a été effectué avec la solution de TE utilisée pour diluer l'échantillon. L'ARN pur a un ratio A_{260}/A_{280} compris entre 1,9 et 2,2.

2.6.4.3 Stabilisation et stockage :

Les échantillons ont été lavés avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et précipités avec 2,5 volumes d'éthanol 100%. Une fois stabilisés, les échantillons ont été conservés à -80°C dans un congélateur "Revco" (Sanyo/ultralow) au sein du laboratoire jusqu'à leur acheminement à l'Université Tulane.

2.6.4.4 Validation des échantillons d'ARN total par le Bioanalyzer 2100 (Agilent®):

Le Bioanalyzer 2100 Agilent est utilisé pour l'analyse par électrophorèse miniaturisée des ADN, ARN, protéines et permet de déterminer leur taille, leur qualité (dégradations /contaminations) et leur concentration. Les échantillons stabilisés avec l'éthanol ont été incubés à -20°C pendant au moins une heure, puis centrifugés à 12000 X g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant a été rejeté et le culot a été ensuite lavé 2 fois avec de l'éthanol 80% (Volume équivalent). Le culot a été séché à l'air libre puis ré suspendu dans 15 µl de QIAGEN buffer BR5.

Après cette étape le kit Rneasy® Cleanup (QIAGEN) a été utilisé pour le lavage des échantillons d'ARN. (Voir annexe 4). Après l'étape de lavage le kit RNA 6000 Nano Assay a été utilisé pour vérifier l'intégrité et la concentration des échantillons d'ARN total par le Bioanalyzer 2100 (Agilent®). Pour chaque réaction 1 µl d'ARN total a été mixé dans une RNA Lab. chip (Caliper-Mountain View, CA) et analysé grâce au Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies-Wekdbronn, GERMANY and Palo Alto, CA), conformément aux instructions du fabricant. Les caractéristiques de l'ARN total intact sont : la présence de 2 pics ribosomaux et 1 pic pour le marqueur.

2.7 Analyse des échantillons par la technique de Microarray :

Après l'étape de validation, les échantillons ont été envoyés pour l'analyse Microarray. La puce HG-U133A 2.0 PUS CHIP a été utilisée pour effectuer l'analyse microarray. Cette puce couvre l'ensemble du génome humain. Le tableau ci dessous résume ses principales caractéristiques.

Tableau IV : Caractéristiques de la puce Affymetrix

Specifications	Gene Chip® Human Genome
Collection	Human Genome U133 Plus
2.0	
Nombre de canaux d'hybridation	1
Nombre de transcrits	~47,400
Nombre de gènes	38,500
Taille de la puce	11µm
Longueur des sondes oligonucléotides	25-mer
Paire de sondes/séquence	11
Séquence contrôle inclus:	
Hybridation contrôles	<i>bioB, bioC, bioD, cre</i>
Poly-A contrôles	<i>dap, lys, phe, thr</i>
Ensemble contrôle de normalisation	GAPDH, beta-actin
Gènes domestiques contrôles	ISGF-3(STAT1)
Sensibilité de la détection	1:100,000*

2.7.1 Marquage de l'ARN et hybridation

L'ARN a été marqué selon le protocole standard Affymetrix. Le marquage a été effectué par le Microarray et Sequencing Core à Tulane dans le centre de thérapie génique. Les ADNc ont été synthétisés à partir de 8 µg d'ARN total. Ils ont été purifiés par une extraction phénol/chloroforme et concentrés par une précipitation avec de l'éthanol. L'ARNc marqué par la biotine a été produit par transcription *in vitro*, purifié par le kit Qiagen RNeasy® et clivé par hydrolyse induite par métal pour produire des fragments d'ARNc de taille

comprise entre 35 et 200 nt. Les ARNc ont été ensuite hybridés à la puce HG-U133 2.0 Plus pendant 16 heures à 45°C.

2.7.2 Scanner la puce et Analyser l'image :

Les puces lavées et marquées ont été scannées par le Microarray Core en utilisant Le GeneArray Scanner de HP et le Microarray Suite 5.0 qui est un logiciel venant de la société Affymetrix. L'intensité des signaux pour les hybridations Perfect Matches (PM) et Mismatches (MM) a été mesurée pour déterminer les adresses sur la puce où les transcrits de gènes sont présents, marginaux ou absents.

Eukaryotic Target Labeling for GeneChip® Expression Analysis

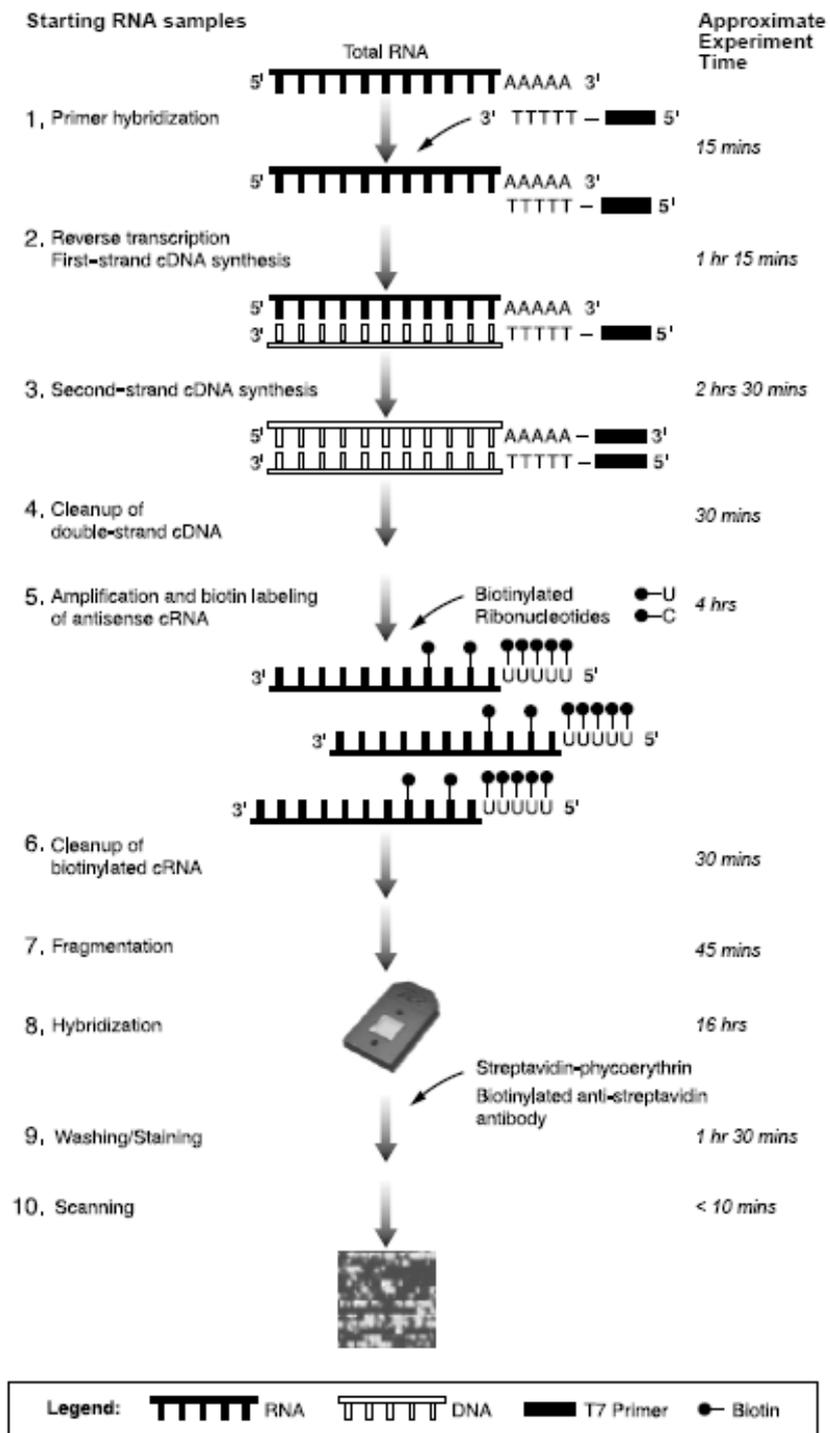


Figure 10: Schéma de la méthodologie des puces à oligonucléotides (Tiré de GeneChip® Expression Analysis *Technical Manual Affymetrix® 1999-2003*).

2.7.3 Analyse des données :

Les images ont été transférées au logiciel dChip, Version Jun 27 2004, (Li and Wong 2001a) où les puces ont été normalisées par rapport à l'intensité du signal lumineux émis par une puce de référence parmi celle étudiées.

Cette étape de normalisation permet de comparer les différents microarrays et d'enlever les erreurs systématiques dans les données.

Les valeurs des expressions ont été déterminées par l'algorithme dChip basé sur les intensités des signaux des PM et MM. L'amplitude des changements d'expression de chaque transcrite ont été estimée par comparaison des 2 premiers échantillons A et B au troisième échantillon C (base). Dans ce cas, seuls les transcrits identifiés comme présent dans au moins 2 échantillons ont été retenus. Une fois les données obtenues, des tests statistiques ont été utilisés pour identifier les gènes dont l'expression variait de façon significative entre les 3 prélèvements (A, B et C).

2.7.4 Test statistiques : Méthodes de filtrage des données

Pour identifier les transcrits qui sont préférentiellement sur ou sous régulés chez des sujets souffrant de paludisme l'analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée sur la moyenne des niveaux d'expression. Ce test ANOVA permet de tester s'il existe une différence significative de moyenne entre les groupes de gènes. La liste des transcrits générés par la procédure a été filtrée pour identifier les gènes dont les niveaux d'expression moyenne variaient entre les différents stades de la maladie. Dans une première analyse seuls les stades A (phase aiguë) et C (guérison) ont été considérés. Une deuxième analyse a pris en compte les 3 stades. La dernière méthode de filtrage employée n'a pris en compte que les gènes dont l'amplitude de la variance atteignaient 1,5.

2.7.5 Classification des gènes et analyse des mécanismes :

Les groupes de transcrits ont été caractérisés par le groupage d'Ontologie génique (Gene ontology : <http://www.geneontology.org/>) et l'analyse des mécanismes a été faite en utilisant le logiciel GenMAPP 2. Le groupage GO permet de définir chaque gène selon la fonction moléculaire, les processus biologiques ainsi que les composants cellulaires qui sont associés à la protéine codée. Il permet en outre de classer les gènes en groupements fonctionnels, de définir la fonction des gènes et d'identifier les nouveaux mécanismes et/ou gènes dont on ne soupçonnait pas l'implication. Ceci pourrait permettre d'élaborer des hypothèses mettant en cause des processus cellulaires impliqués dans le paludisme.

L'analyse des mécanismes permet l'identification des gènes des voies métaboliques spécifiques cellulaires impliquées dans le paludisme. Elle permet également d'identifier des gènes qui agiraient dans de multiples mécanismes ou les mécanismes qui utilisent plusieurs gènes avec des fonctions similaires. Cette analyse peut aussi aider à expliquer les variations interindividuelles observées dans le transcriptome induit en réponse au paludisme.

2.8 Validation des résultats par Real Time reverse transcriptase PCR avec les sondes Taq Man[®] :

La mesure des niveaux d'expression des gènes ainsi que les variations d'expression à travers les 3 stades d'évolution (A, B et C) de la maladie par les microarrays ont été validés par la PCR en temps réel dans la plateforme ABI 7900HT en utilisant des collections de gènes (arrays) immuns pré configurés de faible densité. Ces collections contiennent des amorces préconçues et des sondes Taq Man[®] pour 96 gènes relatifs à l'immunité

L'analyse des échantillons par cette plateforme a été effectuée en même temps que l'analyse microarray. Ce qui permettait la vérification simultanée des résultats fournis par les microarrays.

Les autres mécanismes et gènes relatifs à l'immunité qui ont été identifiés par les microarrays et qui ne sont pas inclus dans les arrays immuns étaient validés par la qRT-PCR (PCR quantitative) traditionnelle dans le Bio Rad iCycler. Cette étape de validation a été achevée à travers la vérification de l'implication du gène ou groupe des gènes cibles à la pathogenèse à travers des approches bio informatiques telles analyse fonction structure des gènes nouvellement incriminés et la documentation scientifique.

RÉSULTATS

1. IDENTIFICATION DES PATIENTS :

1.1 Résultats cliniques :

Tableau V: Distribution de l'échantillon d'étude suivant le sexe et l'âge.

ID	Age	Sexe
214	5 ans	F
13-8	3 ans	F
13-13	2 ans	M
13-14	1an	M
14-3	1an	M
14-4	5 ans	F

Ces enfants avaient un âge inférieur à 6 ans, avec 3 garçons et 3 filles

Tableau VI: Signes cliniques détectables au moment de la première consultation médicale.

ID	Température	Vomissements
2-14	40°C	Non
13-8	38°5 C	Non
13-13	39°C	Non
13-14	40°C	Non
14-3	38°5C	Non
14-4	38°5C	Non

Ce tableau montre que tous les enfants étaient fébriles avec une température supérieure à 37°5 C et ne vomissant pas. La température la plus élevée était de 40°C

Tableau VII: Date de prélèvement et molécules antipaludiques administrées

ID	A	B	C	Traitement
2-14	30/07	02/08	06/08	Quinine+Chloroquine
13-8	06/12	08/12	15/12	Chloroquine
13-13	06/12	08/12	15/12	Quinine+Chloroquine
13-14	06/12	08/12	15/12	Quinine+Chloroquine
14-3	08/12	10/12	17/12	Quinine+Chloroquine
14-4	08/12	10/12	17/12	SP+Chloroquine

Les patients ont été prélevés le 1^{er} jour, suivi d'un deuxième prélèvement le 3^{ème} jour après l'administration du traitement antipaludique. Le dernier prélèvement a été effectué le 10^{ème} jour. Le traitement le plus utilisé a été l'association chloroquine quinine. Seul le patient 14-4 a été traité avec une association de sulfadoxine pyriméthamine et chloroquine, le patient 13-8 par contre a été traité avec de la chloroquine seule.

1.2 Résultats parasitologiques :

1.2.1 Résultats microscopiques :

Tableau VIII: Stades d'évolution et densité parasitaire

ID	(A) Parasites/mm ³	(B) Parasites/mm ³	(C) Parasites/mm ³
214	32175	0	0
13-8	2250	20	0
13-13	3475	148	0
13-14	9300	75	0
14-3	18175	100	0
14-4	90600	75	0

La densité parasitaire la plus faible était de 2250 et la plus élevée de 90600 parasites/mm³. Nous n'avons pas retrouvé de souches résistantes aux médicaments utilisés. Ce tableau montre une clairance totale de la parasitémie le 10^{ème} jour après l'administration des molécules antipaludiques.

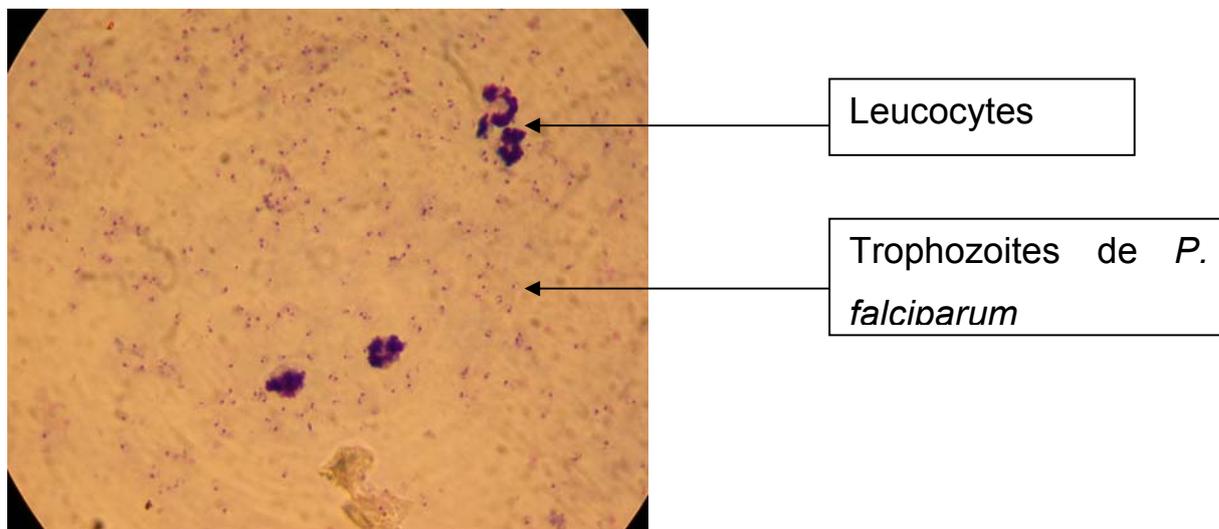


Figure 11 : Photo d'une goutte épaisse positive de l'échantillon 14-4 lors de sa première consultation.

Sur le champ microscopique nous observons la présence de plusieurs parasites de *P. falciparum* au stade de trophozoïtes ainsi que quelques leucocytes.

1.2.2 Résultats Moléculaires :

Tableau IX: Identification par PCR des différents allotypes et taille des amplicons en paires de bases au stade **A** (J0).

ID	K1 (pb)	MAD20 (pb)	RO33 (pb)	M/R (pb)
2-14	0	0	154	0
13-8	0	0	158	0
13-13	234	0	173	0
13-14	175	0	0	0
14-3	204,214	0	165	0
14-4	204	0	0	0

Ce tableau montre que les patients 13-13 et 14-3 avaient de multiples infections (K1 et RO33) par contre les autres patients avait un seul allotype soit K1 ou RO33. Nous n'avons pas observé d'infection avec l'allotype MAD20 ou l'allotype hybride MAD20/RO33.

Tableau X: Identification par PCR des différents allotypes et taille des amplicons en paires de bases au stade **B**. (J3)

ID	K1 (pb)	MAD20 (pb)	RO33 (pb)	M/R(pb)
2-14	0	0	0	0
13-8	0	0	169	0
13-13	234	0	181	0
13-14	0	0	0	0
14-3	0	0	0	0
14-4	0	0	0	0

Au stade B (J3) la technique de la PCR a détecté la présence de l'allotype RO33 chez le patient 13-8, ainsi que la présence des allotypes K1 et RO33 chez le patient 13-13. Nous n'avons pas observé l'allotype MAD20 ou l'hybride MAD20/RO33. Nous remarquons un début de clairance des allotypes avec les patients 214,13-14,14-3.

Tableau XI: Identification par PCR des différents allotypes et taille des amplicons en paires de bases au stade C (J10).

ID	K1 (pb)	MAD20 (pb)	RO33 (pb)	M/R(pb)
2-14	0	0	0	0
13-8	0	0	0	0
13-13	0	0	0	0
13-14	0	0	0	0
14-3	0	0	0	0
14-4	0	0	0	0

Ce tableau montre que tous les patients ne présentaient plus d'infections 10 jours après le traitement. Aucun produit de PCR n'a été obtenu. Nous avons obtenue une clairance totale au 10^{ème} jour du traitement.

Tableau XII: Répartition de la clonalité de l'infection en fonction des stades d'évolution de la maladie.

Stades	Clonalité		
	Mono	Poly	Total
A (J0)	4	2	6
B (J3)	1	1	2
C (J10)	0	0	0
Total	5	3	8

Nous n'avons eu que deux infections polyclonales avec les allotypes K1 et RO33 ainsi que quatre infections monoclonales avant le traitement, le troisième jour après le traitement nous avons constaté une infection monoclonale et une infection polyclonale.

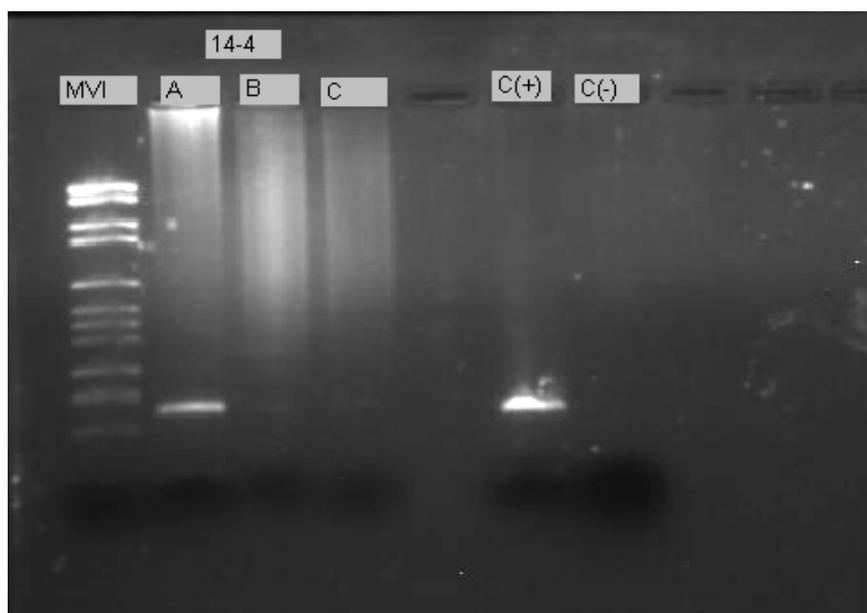


Figure 12: Photo de gel d'agarose illustrant l'évolution de l'allotype K1 identifié chez le patient 14-4. Cette photo indique que l'allotype K1 identifié par la présence d'une bande de 204 pb au stade A disparaissait au bout de 3 jours de traitement antipaludique. Nous avons utilisé la souche clone Haïti 135 de *Plasmodium*

falciparum comme contrôle positif et de l'eau pour PCR (*Molecular biology grade water, Biosource*) comme contrôle négatif.

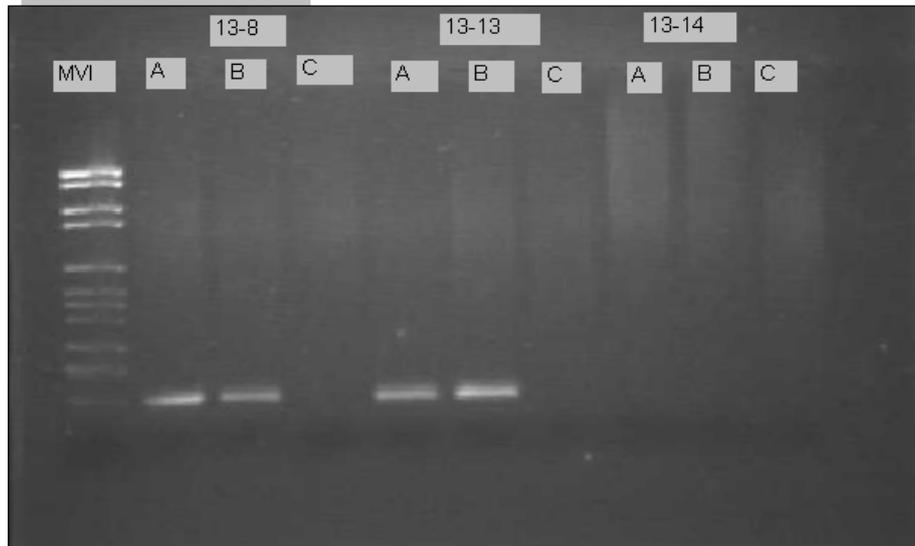


Figure 13: Photo de gel d'agarose 2% illustrant l'évolution de l'allotype RO33 chez quelques patients de Banconi.

Cette photo indique que les patients 13-8 et 13-13 étaient infectés par un allotype RO33 qui persistait le 3^{ème} jour après traitement mais qui disparaît au bout de 10 jours de traitement. Le patient 13-14 par contre n'était pas infecté par l' allotype RO33.

2. ISOLATION D'ARN TOTAL:

Nous avons optimisé nos procédures d'isolation des molécules d'ARN. Ainsi nous avons comparé les méthodes de séparation leucocytaire avec du sang collecté dans un tube avec anticoagulant (Héparine de lithium), avec celle utilisant un gradient de densité (LSM) et celle avec un séparateur couplé à un gradient de densité (tubes BD Vacutainer CPT™).

2.1 Résultats du test des techniques de lymphoséparation :

Le test a été effectué à partir de sang total prélevé sur des donneurs sains et asymptomatiques

2.1.1 Tube avec héparine de lithium :

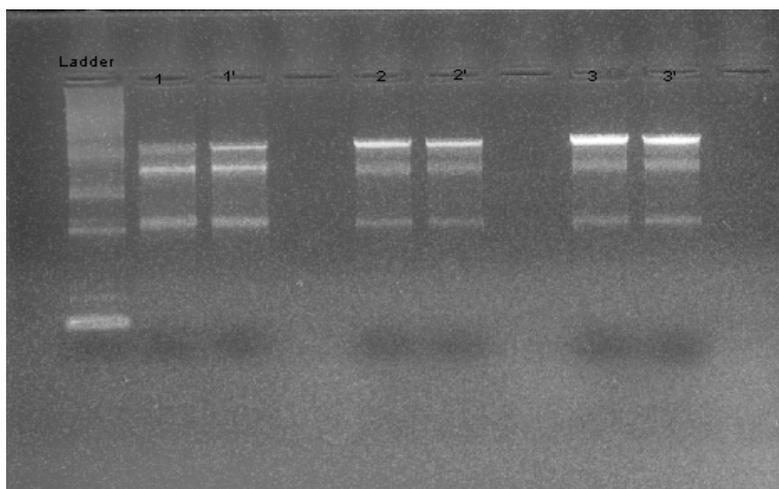


Figure 14: Photo d'électrophorèse sur gel d'agarose 1% d'ARN total isolé à partir de la fraction leucocytaire.

Photo de gel montrant la présence des bandes représentant les molécules d'ARN total. Nous nous attendions à la présence de deux bandes représentant les deux sous-unités ribosomales 28S et 18S. Une troisième bande beaucoup plus petite était visible.

8.2.5 Tubes BD Vacutainer CPT™ Citrate et LSM :

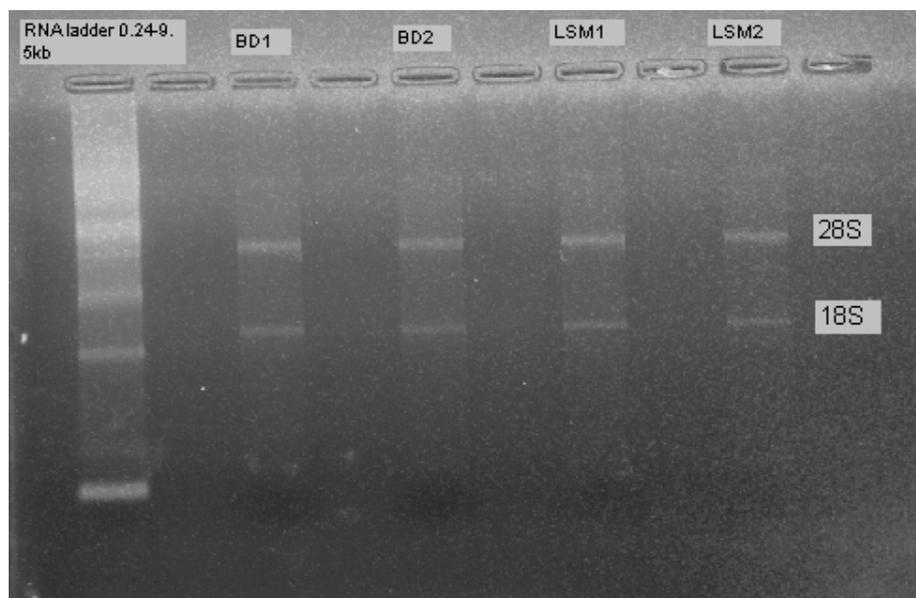


Figure 15: photo de l'électrophorèse sur gel d'agarose 1% d'ARN total à partir de cellules mononucléaires obtenues par les méthodes des tubes BD Vacutainer CPT™ et LSM (Ficcoll®).

La présence des deux bandes des sous unités ribosomales 28S et 18S prouve que les molécules d'ARN total isolées sont d'une intégrité parfaite. Les deux techniques de lymphoséparation donnent sensiblement les mêmes résultats.

Après cette étape d'optimisation la technique de tube avec séparateur (BD vacutainer CPT™) a été retenue en raison des commodités d'utilisation sur le terrain).

3. EXAMEN DES MOLECULES D'ARN TOTAL EXTRAIT :

Les molécules d'ARN total extraites à partir de cellules mononucléaires isolées en utilisant les tubes BD Vacutainer CPT™ et le kit d'isolation d'ARN total RiboPure™-Blood (Ambion®).

Nous avons testé l'intégrité, la concentration et le degré de pureté de nos molécules d'ARN total extraites grâce à trois méthodes :

3.1 Evaluation de la concentration et de la pureté par la spectrophotométrie :

Tableau XIII : Dosage spectrophotométrique de l'ARN total au stade A (J0)

ID	A à 260 nm	A à 280nm	Conc.(µg/ml)	A_{260}/A_{280}
214	0,106	0,050	84,612	2,1055
13-8	0,031	0,013	24,94	2,3788
13-13	0,047	0,021	37,65	2,2041
13-14	0,072	0,040	57,44	1,7981
14-3	0,043	0,017	34,694	2,5984
14-4	0,038	0,022	30,408	1,6970

Ce tableau nous montre les concentrations, les ratios des absorbances à 260 et 280 nm de l'ARN total isolé à partir des échantillons prélevés le jour du 1^{er} examen clinique des patients. La concentration la plus faible a été obtenue avec l'échantillon 13-8A et la plus élevée avec l'échantillon 214.

Tableau XIV : Dosage spectrophotométrique de l'ARN total au stade B (J3)

ID	A à 260 nm	A à 280nm	Conc (µg/ml)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
214	0,229	0,102	183,208	2,2533
13-8	0,052	0,021	41,392	2,5170
13-13	0,063	0,031	50,122	2,0278
13-14	0,107	0,055	85,598	1,9355
14-3	0,037	0,016	24,846	2,2803
14-4	0,122	0,069	97,382	1,7626

Ce tableau nous montre les concentrations, les absorbances à 260 et 280 nm ainsi que les ratios de l'ARN total isolé à partir des échantillons prélevés le 3^{ème} jour après le traitement antipaludique. La concentration la plus faible a été obtenue avec l'échantillon 14-3B et la plus forte avec l'échantillon 214 B.

Tableau XV: Dosage spectrophotométrique de l'ARN total au stade C (J10)

ID	A à 260 nm	A à 280nm	Conc (µg/ml)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
214	0,206	0,093	172,114	2,2067
13-8	0,347	0,163	277,546	2,1343
13-13	0,143	0,068	114,05	2,1008
13-14	0,172	0,082	137,45	2,1013
14-3	0,060	0,031	47,78	1,9267
14-4	0,088	0,046	70,192	1,9184

Ce tableau nous montre les concentrations, les absorbances à 260 et 280 nm ainsi que les ratios de l'ARN total isolé à partir des échantillons prélevés le 10^{ème} jour après le traitement antipaludique.

La concentration la plus faible a été obtenue avec l'échantillon 14-3C et la plus forte avec l'échantillon 13-8C.

3.2 Evaluation de l'intégrité des molécules des ARN ribosomiaux 28S et 18S de l'ARN total :

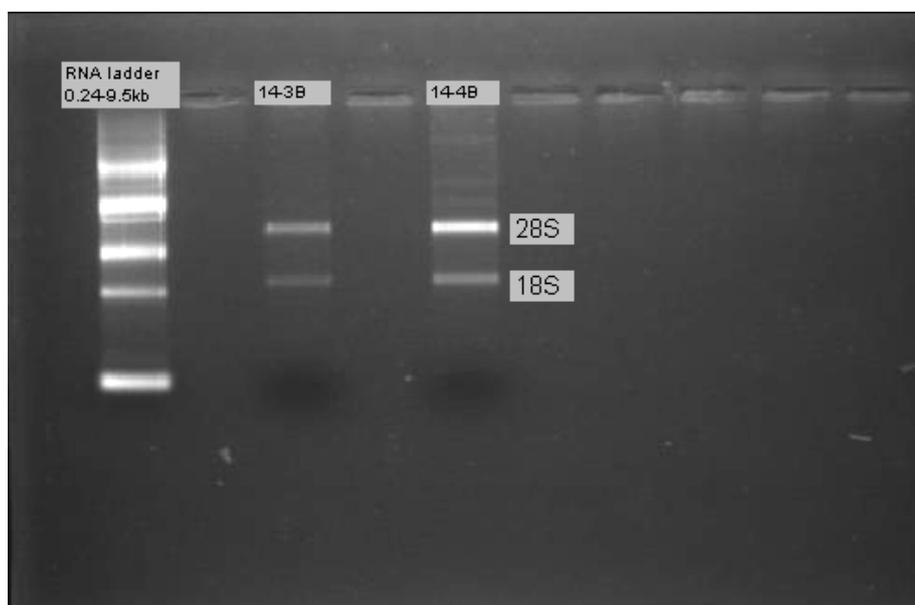


Figure 16: Exemple de deux échantillons provenant de l'ASACOBA de Banconi électrophorèse d'ARN total sur support d'agarose à 1% des échantillons 14-3B et 14-4B.

La présence des deux bandes distinctes des sous unités ribosomiales 28S et 18S atteste que l'ARN total n'a pas subi de dégradation lors de son isolation.

Tous les 18 échantillons présentaient une intégrité parfaite sur gel d'agarose.

La taille des bandes était estimée par le logiciel KODAK 1D version 3.5.4 grâce la présence sur le gel du marqueur moléculaire de taille RNA *ladder* 0.24-9.5 kb (Invitrogen®).

Tableau XVI: Estimation de la taille en paire de bases des sous unités ribosomales 28s et 18S de l'ARN total

ID	28S (pb)	18S (pb)
214 A	5149	1778
13-8 A	5448	1589
13-13 A	5658	1643
13-14 A	5615	1634
14-3 A	5037	1782
14-4 A	5420	1800
214 B	5149	1778
13-8 B	4281	1661
13-13 B	4340	1679
13-14 B	4528	1758
14-3 B	3758	1641
14-4 B	3866	1690
214 C	5144	1778
13-8 C	4400	1792
13-13 C	4783	1758
13-14 C	4783	1758
14-3 C	5976	1726
14-4 C	6161	1806

Ce tableau récapitule les tailles des bandes ribosomales 28S et 18S. Ces données ont été obtenues par analyse des bandes sur gel d'agarose avec le logiciel KODAK 1D (version 3.5.4).

3.3 Analyse des échantillons par le Bioanalyzer 2100 (Agilent®)

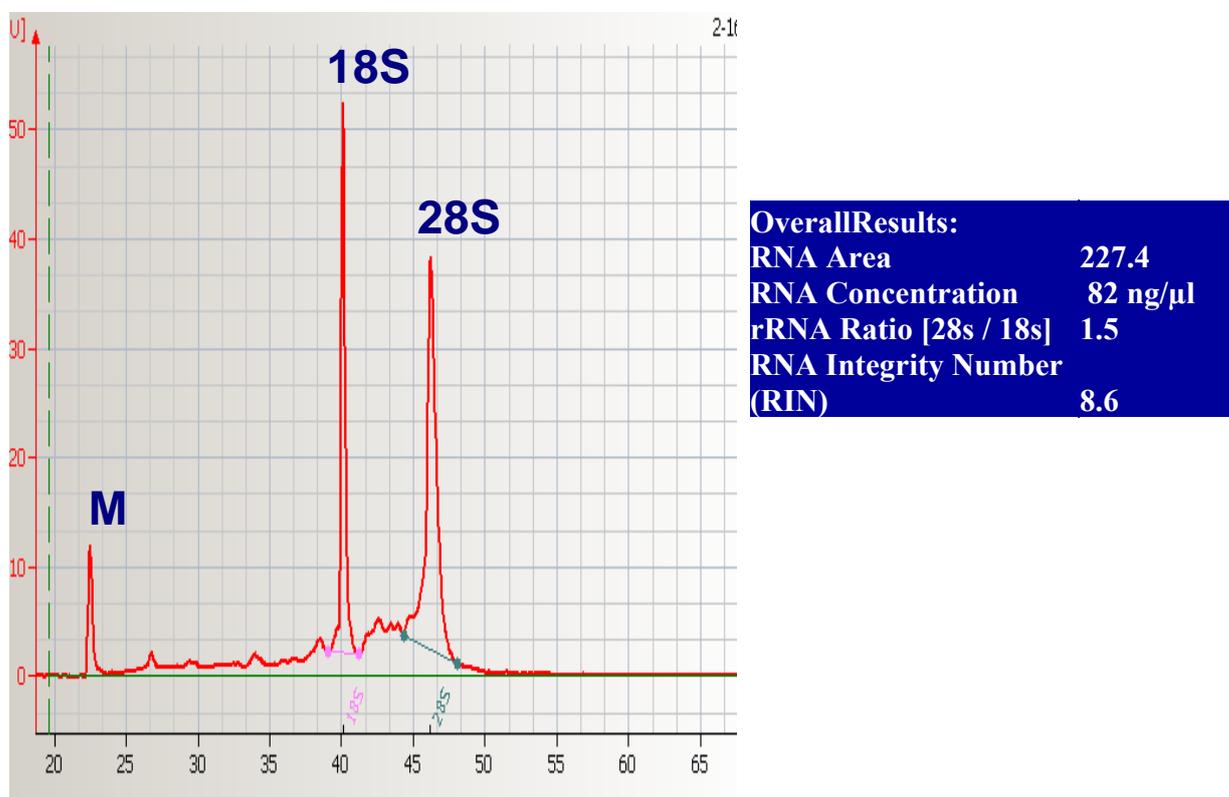


Figure 17: Vérification de l'intégrité des sous unité ribosomales 28S et 18S de l'ARN total par le Bioanalyzer 2100 (Agilent®): cas de l'échantillon 214 A. L'analyse de cet échantillon a montré que la concentration était de 82 ng/ml, RIN était supérieur à 6 attestant une bonne intégrité de l'ARN.

Pour confirmer l'intégrité des molécules d'ARN après leur envoi aux USA et avant de leur appliquer la technique de Microarray, les échantillons ont été assujettis vérification par le Bioanalyzer 2100 (Agilent®).

4. ANALYSE MICROARRAY :

Une fois les molécules d'ARN total validées par les trois techniques, elles ont été hybridées sur la plateforme Affymétrie[®] en utilisant la puce HG-U133A 2.0 plus contenant 38500 gènes humains bien caractérisés. Les données ont été analysées avec le logiciel dCHIP. (Li et Wong 2001a).

Plusieurs méthodes de filtrage ont été employées: ANOVA (Analyse of variance) et une méthode de filtrage avec 1,5 comme seuil de filtrage (Fold Change).

Les résultats des analyses statistiques des données varient en fonction de la méthode de filtrage utilisée.

Les gènes du cytosquelette ont été identifiés au cours de l'analyse. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les 3 stades A, B et C les *p-values* varient entre 0,38 et 0,62 ($p=0.38$ et 0.62) pour tous les 18 échantillons.

4.1 Les résultats obtenus par comparaison des stades A et C : Profil d'expression globale des 6 sujets humains :

Les données ont été filtrées par comparaison des échantillons de la phase aiguë de la maladie (A) et ceux de contrôle (C) par la test ANOVA. 536 gènes ont été identifiés comme ayant une variation statistiquement significative dans leur expression moyenne chez tous les 6 sujets avec une $p\text{-value} = 0,005$. Sur les 536 gènes, 380 étaient sur régulés et 156 sous régulés.

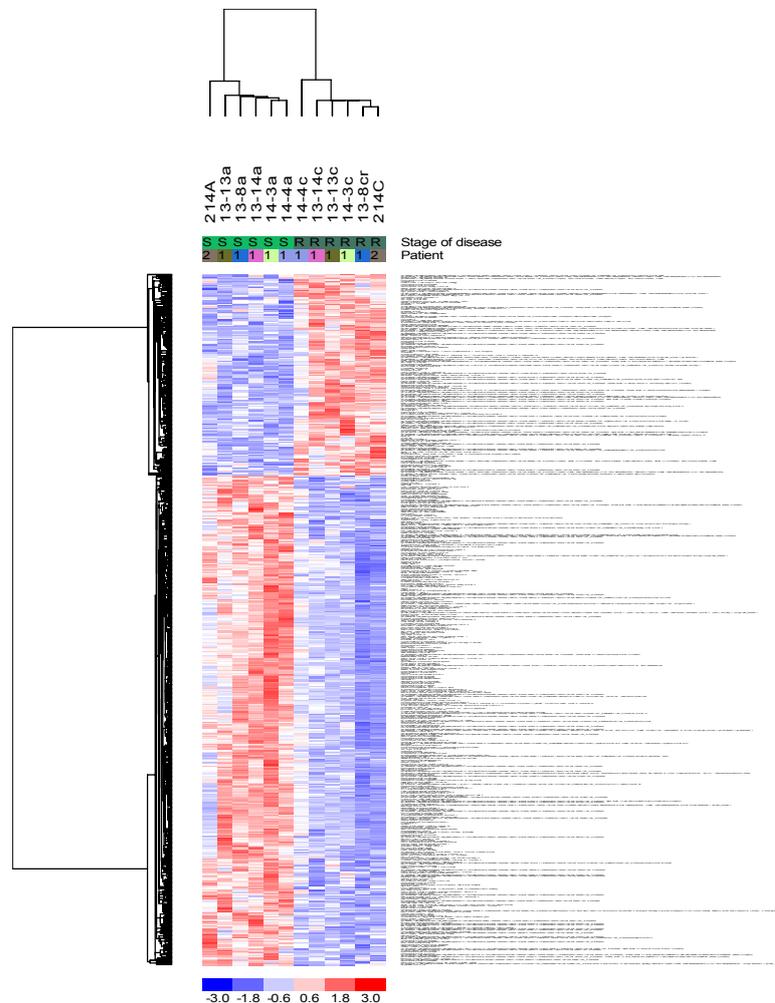


Figure 18: Profil d'expression des gènes durant les 2 stades d'évolution de l'infection analysés A et C (Visualisation graphique).

Tableau XVII : Résultats de la 1^{ère} analyse par le filtrage ANOVA

Total des gènes sur régulés pendant l'infection: 380		
Gene Ontology Group	p value	
“ vacuole lytique ”	0.000014	
“lysosome”	0.000014	
Exemples de gènes venant de groupes d'ontologie génique		
Nom des gènes	Expression moyenne pendant l'infection	Expression moyenne. de après guérison
CD63 antigen (melanoma 1 antigen)	653	211
interferon, gamma-inducible protein 30	2304	723

Ce tableau montre l'exemple de gènes et de mécanismes cellulaires définis par l'Ontologie Génique (GO). Les niveaux d'expression moyens des gènes indiquent qu'ils sont sur régulés au moment de l'apparition des symptômes cliniques (A) comparativement à la phase de guérison (C) du patient. L'expression génétique des composants cellulaires tels que la vacuole lytique et les lysosomes varie de façon statistiquement significative entre les deux types échantillons (A et C) chez tous les patients.

4.2 Les résultats obtenus par comparaison des 3 stades (A, B, C) :

4.2.1 Profil d'expression génétique global des 6 sujets :

Le test ANOVA a été utilisé pour voir s'il y a une différence statistiquement significative entre les profils d'expression génétique par patient. Cette analyse a pris en compte les 3 échantillons (A, B, C). Ainsi, sur un total de 269 gènes ont été identifiés, 138 étaient sur régulés soit (51,3%) entre la phase aiguë (A et B) et la phase de guérison (C) du paludisme pendant notre étude.

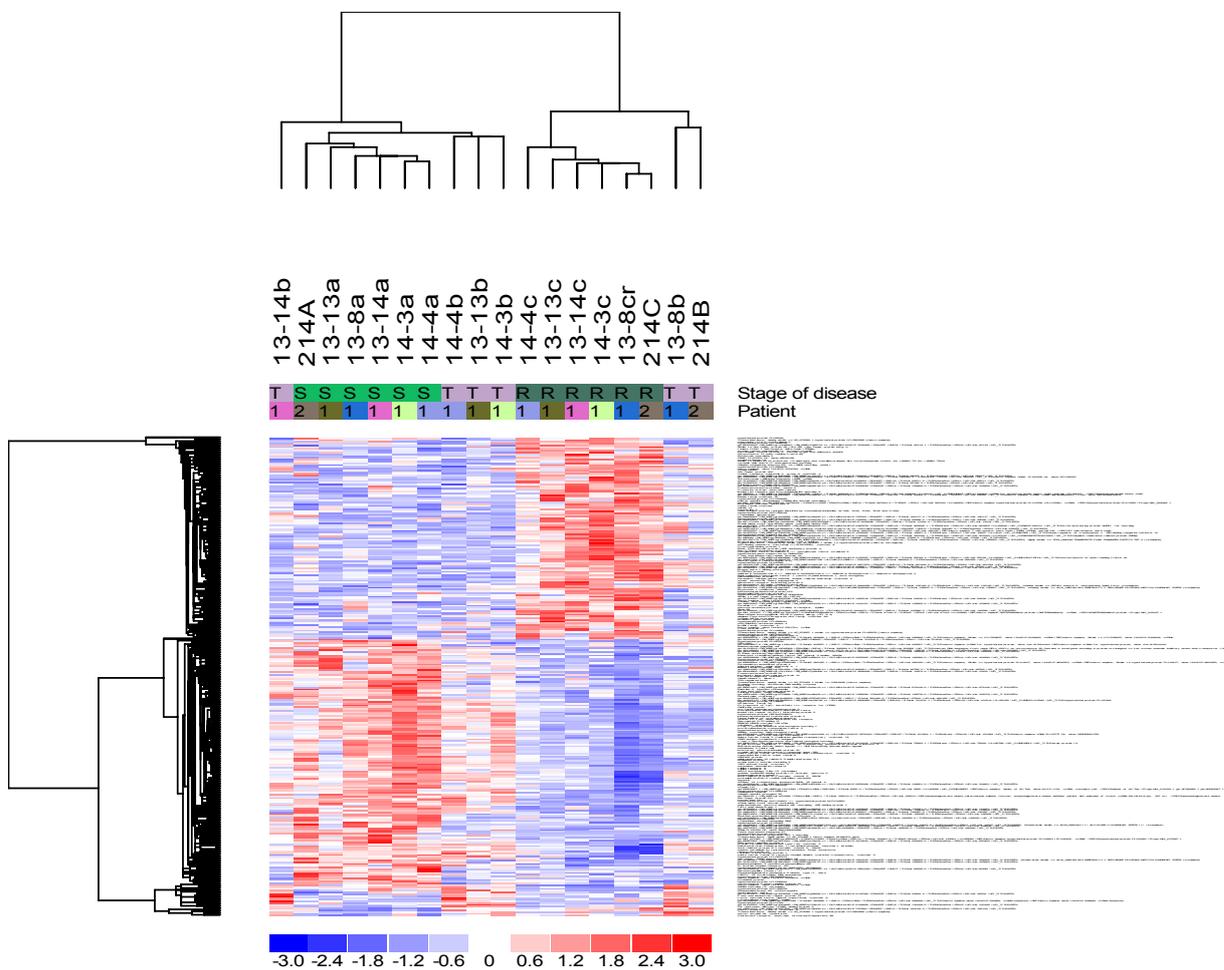


Figure 19: Expression globale (visualisation graphique) chez tous les 6 sujets selon les 3 stades.

Expressions des 269 gènes identifiés comme ayant une variation statistiquement significative de l'expression génétique entre les trois prélèvements (A-B-C). Les couleurs rouges représentent les gènes dont l'expression est induite et les couleurs bleues les gènes dont l'expression est réprimée.

L'intensité de la couleur est proportionnelle à la fixation de la cible à la sonde. Une différence statistique ($P=0,005$) était observée entre tous les échantillons A (expression génétique avant le traitement), les échantillons intermédiaires B (expression génétique 3 jours après le traitement) et les échantillons de base (10^{ème} jour après le traitement, représentant l'état physiologique normal du patient).

4.2.2 Répartition des allotypes du gène MSP-1 de *P. falciparum* en fonction des profils d'expression génétique des patients :

- PATIENT 13-8 :

Le sujet était infecté par l'allotype RO33 (151 pb) avant le traitement, cet allotype persistait 3 jours après. Nous suggérons que cet l'allotype RO33 avait induit l'expression génétique que nous avons observé chez le patient.

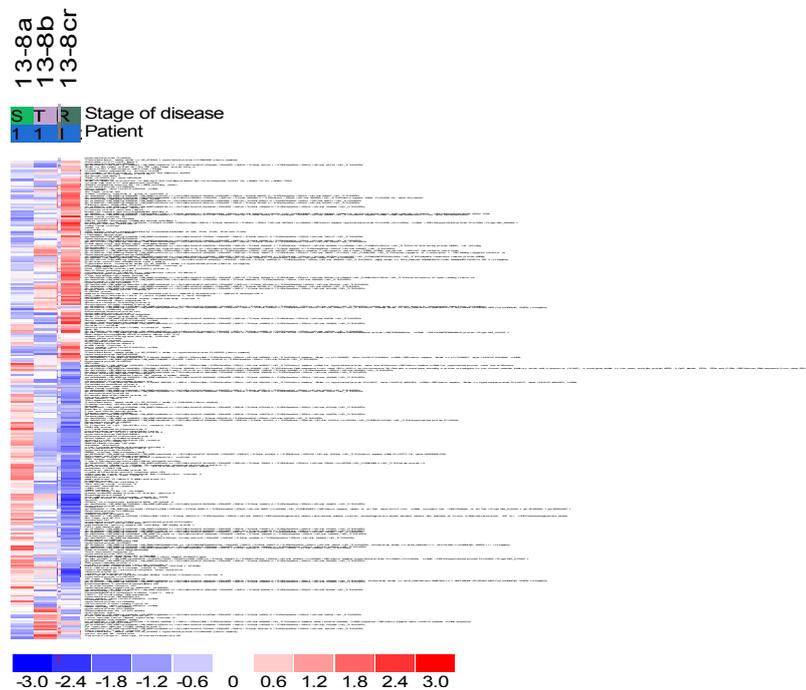


Figure 20: Visualisation graphique du profil d'expression génétique du patient 13-8 pour les stades A, B et C.

- PATIENT 13-13:

Le sujet était infecté par plusieurs allotypes : K1 (234 pb) et RO33 (173 pb) du gène MSP-1 de *Plasmodium falciparum* avant le traitement et 3 jours après. Nous pensons que cette infection à plusieurs allotypes serait responsable l'expression génétique que nous avons observée chez le patient.



Figure 21: Visualisation graphique du profil d'expression génétique du patient 13-13 pour les stades A, B et C.

- PATIENT 13-14 :

Le sujet avait une infection monoclonale à K1 (175 pb) avant le traitement par contre cet allotype disparaissait 3 jours après. Le profil d'expression présenté par ce patient pourrait être dû à la présence de cet allotype K1

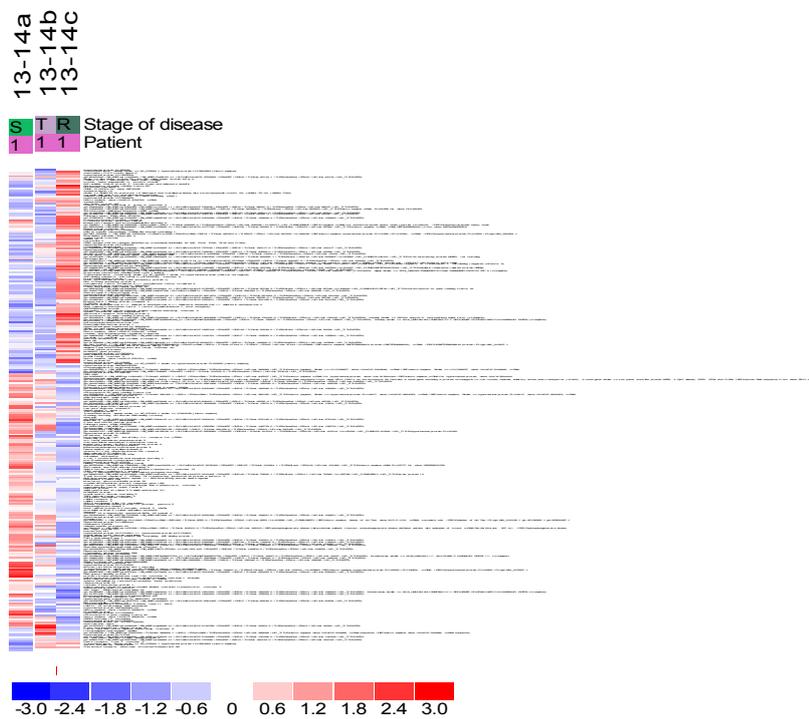


Figure 22: Visualisation graphique du profil d'expression génétique du patient 13-14 pour les stades A, B et C.

- PATIENT 14-3 :

Le sujet avait une infection polyclonale avec les allotypes K1 et RO33. Les tailles respectives étaient de 204pb et 214pb pour K 1 et 165 pb pour RO33 avant le traitement par contre ces allotypes disparaissaient 3 jours après. Nous suggérons que cette infection polyclonale est à la base de l'expression génétique que nous avons observée chez le patient.

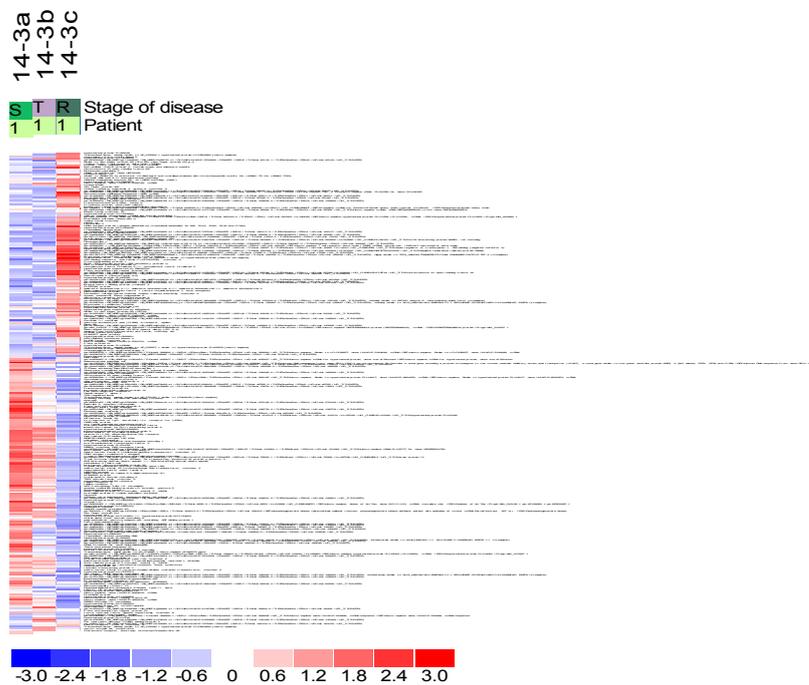


Figure 23: Visualisation graphique du profil d'expression génétique du patient 14-3 pour les stades A, B et C.

- PATIENT 14-4 :

Le sujet avait une infection monoclonale avec l'allotype K1 (204 pb) avant le traitement par contre cet allotype disparaissait 3 jours après traitement. La présence de cet allotype pourrait induire l'expression génétique que nous avons observée chez le patient.



Figure 24: Visualisation graphique du profil d'expression génétique du patient 14-4 pour les stades A, B et C.

- PATIENT 214 :

Le sujet avait une infection monoclonale avec l' allotype RO33 (154 pb) avant le traitement par contre cet allotype disparaissait 3 jours après. Nous suggérons que l'infection par cet allotype pourrait induire l'apparition du transcriptome que nous avons observé chez le patient.

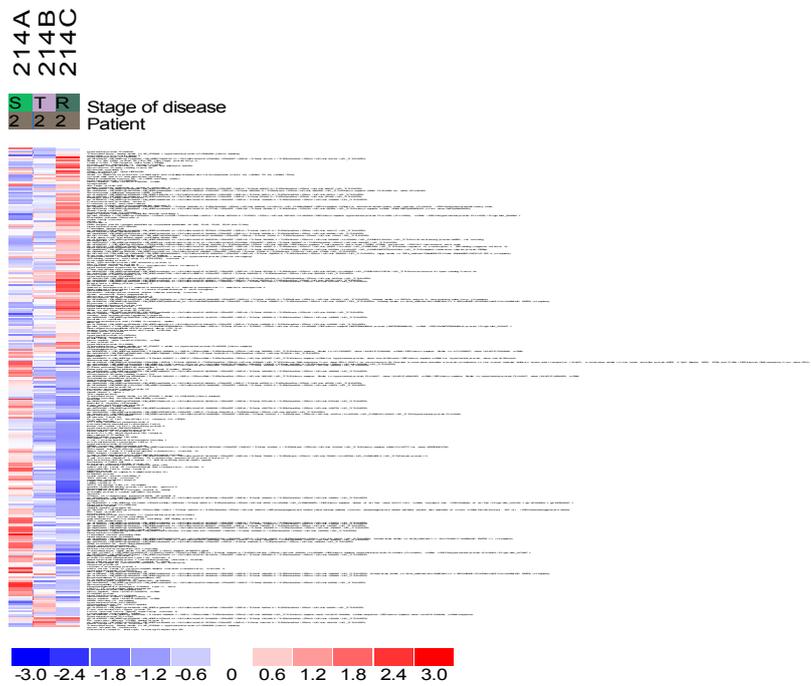


Figure 25: Visualisation graphique du profil d'expression génétique du patient 214 pour les stades A, B et C.

Tableau XVIII : Résultats de la 2^{ème} analyse ANOVA

Total des gènes sur régulés pendant l'infection: 138			
Nom des gènes	Niveaux d'expression moyenne par échantillon		
	A	B	C
interferon, gamma-inducible protein 30	2304	1571	723
T-cell, immune regulator 1	359	209	124
toll-like receptor 2	333	144	88
Myeloid differentiation primary response gene (88)	648	451	238
toll-like receptor 5	45	22	15
Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32)	248	178	82

Ce tableau montre l'exemple de 6 gènes définis par la classification GO qui étaient sur régulés durant l'infection. Leurs niveaux d'expression moyens à chaque stade diminuent progressivement en passant du stade de phase aigue (A) du paludisme au stade de guérison (C).

4.3 Comparaison des profils de l'expression génétique selon l'amplitude de la variation dans l'expression entre les 2 stades A et C (pendant et après le paludisme).

Une méthode statistique de filtrage encore plus stricte a été utilisée pour discriminer les gènes fortement exprimés ou réprimés chez les patients avec une différence de niveau d'expression supérieure ou égale à 1,5. Ainsi 109 gènes ont été identifiés dont 51 étaient sur régulés et 58 étaient sous régulés.

4.3.1 Profil d'expression globale chez tous les 6 patients :

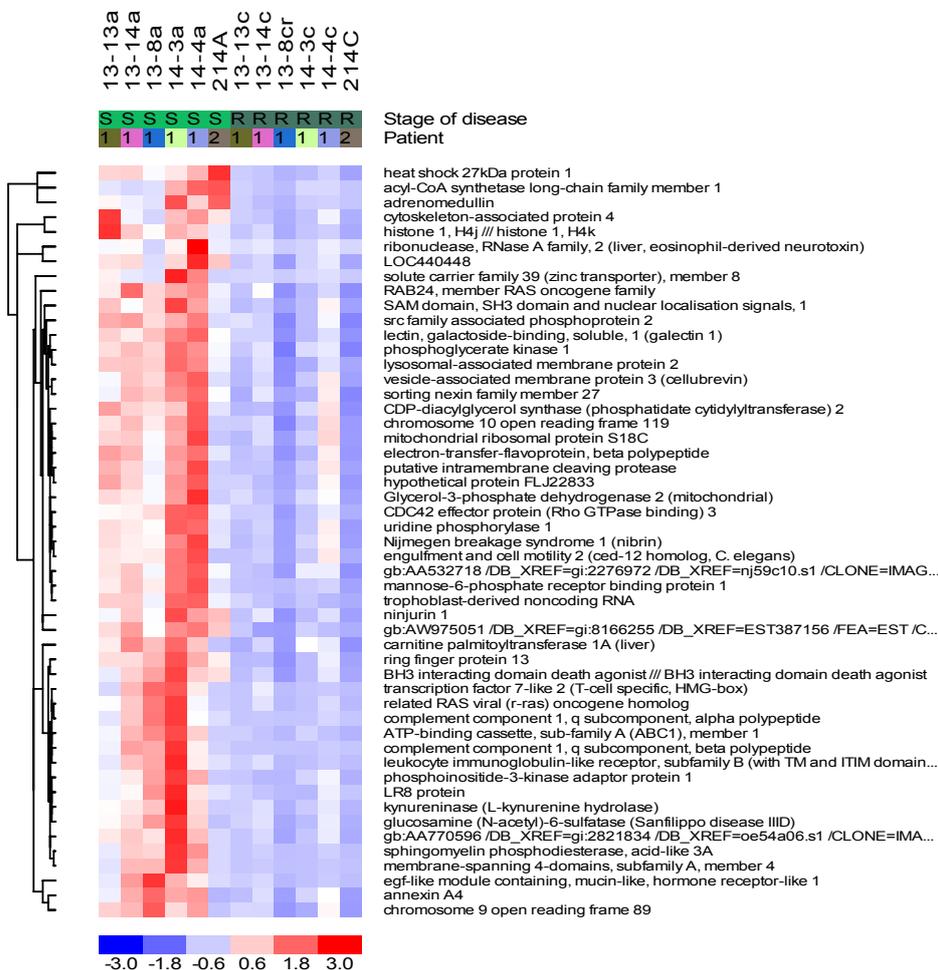


Figure 26: Profil d'expression des gènes durant les 2 stades d'évolution de l'infection analysés A et C. Visualisation graphique des données avec la méthode de filtrage avec comme seuil 1,5.

Tableau XIX: Résultats de gènes représentatifs identifiés par la méthode de filtrage Fold Change

Gènes sur régulés pendant l'infection	Gènes sous régulés pendant l'infection
mannose-6-phosphate receptor binding protein 1	interleukin 1 family, member 5 (delta)
complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	interleukin 17F
complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	immunoglobulin mu binding protein 2
transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	zinc finger, FYVE domain containing 19

Ce tableau montre un exemple de gènes dont l'expression est modifiée entre la phase aigue de la maladie et de guérison du patient. Ces gènes sont groupés par classification GO.

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

A. DEMARCHE METHODOLOGIQUE :

- Design de l'étude :

L'expression génétique est très variable d'un individu à un autre. La méthodologie adoptée au cours de notre étude permet de minimiser l'impact de cette variation. Les valeurs des expressions génétiques des échantillons **A** et **B** qui représentaient l'état pathologique de l'enfant ont été comparées à la valeur de l'expression génétique de l'échantillon contrôle **C** pour le même patient. Chaque individu devenant ainsi son propre contrôle.

Cette méthodologie nous a permis de corrélérer la variation de l'expression gènes spécifiques à l'évolution de la maladie.

- Isolation d'ARN :

Une optimisation des techniques de séparation cellulaire a été nécessaire. Le but étant d'identifier la technique la plus appropriée pour la récupération de cellules mononuclées intactes. Ceci pour l'isolation de molécules d'ARN de qualité et d'intégrité suffisante pour être utilisées par une technologie de pointe comme les microarrays.

L'isolation de cellules mononuclées sur le site de Banconi a présenté certaines difficultés car la température ambiante était souvent très élevée et les conditions de prélèvement ne permettaient pas d'inactiver complètement les RNases du milieu ambiant. Une contamination des échantillons par de telles enzymes aboutit inexorablement à la destruction totale ou partielle de l'ARN en quelques minutes.

En outre la quantité d'ARN messenger minimale pour une puce à ADN (Microarray) est d'environ 8 µg d'ARN messenger. Les quantités d'ARN obtenues sont des quantités de l'ARN total dont l'ARN messenger ne constitue qu'une faible fraction (environ 10%).

- La cible cellulaire :

Nous reconnaissons qu'en isolant l'ARN seulement les cellules mononuclées, nous n'avons analysé qu'une partie du transcriptome et il est possible que nous ayons raté les contributions importantes des autres types de cellules. Cependant, compte tenu du fait il ne nous ait pas possible de prélever un autre type de matériel biologique que le sang chez les enfants, cette méthodologie semble acceptable.

- L'échantillonnage :

L'échantillonnage n'est pas représentatif mais il nous a permis de tester notre approche méthodologique.

Le prélèvement d'une série de trois échantillons sanguins chez des enfants malades probablement anémiés a été effectué de façon à prendre en compte leur état. Pour cette raison le volume de sang prélevé a été limité à 3 ml. Cette étude prouve que ce volume est suffisant pour l'isolation d'ARN et ne compromet pas la santé de l'enfant malade. Les procédures de prélèvement de sang ont également été réalisées de façon à tenir en compte l'état du patient : en utilisant des aiguilles Vacutainer 23G ¼ Brand (Beckson dickson) de taille appropriée pour les veines de l'enfant. Le sang a été aspiré grâce à une seringue et non pas sur tube car ceux-ci étant sous pression, cela risquerait de provoquer un collapsus au niveau des veines.

Tous les patients inclus dans cette étude avaient un âge inférieur ou égal 5 ans. Notre échantillonnage a été effectué dans la tranche de population la plus exposée par cette maladie. Sur le plan clinique une nette amélioration de l'état général a été constatée chez tous les patients à partir du 3^{ème} jour et elle était totale au 10^{ème} jour après le traitement antipaludique. Nous avons donc

l'assurance que les signes cliniques décelés lors de l'examen initial des patients étaient bien dûs aux parasites de *P. falciparum*.

L'identification microscopique et moléculaire par PCR des parasites de *P. falciparum* au cours des trois visites des patients a confirmé l'efficacité du traitement. Tous les patients étaient traités avec des associations de molécules antipaludiques à l'exception du patient 13-8 qui est le seul à avoir été traité avec la chloroquine en monothérapie. Une diminution de la parasitémie était perceptible chez tous les 6 patients au bout de 3 jours de traitement avec cependant des différences de sensibilités aux antipaludéens présentés par les souches de *P. falciparum* rencontrées. La clairance était totale au bout des 10 jours.

La technique de la PCR nichée présente un grand intérêt du fait de sa grande sensibilité par rapport aux techniques microscopiques. Le fait d'effectuer un génotypage des souches de *Plasmodium* avec le marqueur moléculaire de MSP-1 présente plusieurs avantages dont celui de pouvoir confirmer les résultats de la goutte épaisse et du frottis mince mais aussi elle nous permet de savoir à quel(s) allotype(s) du gène MSP-1 de *Plasmodium falciparum* avons nous à faire, permettant ainsi d'établir une liaison entre les symptômes cliniques présentés, le profil d'expression génétique présenté et l'allotype détecté.

Ceci est un élément qui a son importance surtout quand nous savons que les souches de *plasmodium* n'ont pas les mêmes facteurs de virulence (cytoadhérence, sécrétions de toxines pyrogènes, résistance aux traitements antimalariques). Il apparaît clair les souches de plasmodiums n'ont pas le même pouvoir immunogène. Il serait bon d'élargir notre échantillonnage pour établir des relations entre le profil d'expression génétique des patients infectés et les souches plasmodiales ayant un répertoire antigénique différent.

Notre analyse ne nous a pas permis de corrélérer un profil d'expression spécifique des cellules mononucléaires à un allotype particulier du gène MSP-1 de *Plasmodium falciparum* à cause de la faiblesse notre échantillonnage et aussi parce que plusieurs patients étaient infectés par plus d'un allotype.

Cependant MSP-1 a été incriminé dans plusieurs études comme étant une des cibles potentielles du système immunitaire. En effet La partie terminale de MSP1 code pour un fragment de 19 kDa qui est lié à la membrane plasmique par une molécule d'ancrage, le glycosylphosphatidylinositol (GPI). Ce fragment de 19 kDa apparaît être une cible pour le système immunitaire. En outre le GPI est une puissante toxine capable d'engendrée une forte réponse immune (Shai *et al.*, 1994). Notre étude prend donc en compte deux facteurs dont l'un lié à la génétique du parasite (gène MSP-1) et l'autre à celle de l'hôte humain (la réponse de l'hôte en terme d'expression génétique).

La limite d'une telle démarche réside dans le fait que choisir un marqueur moléculaire polymorphique tel que MSP-1 présente le risque que les amorces utilisées ne reconnaissent pas les nouvelles souches recombinées au niveau du bloc 2 que nous savons très polymorphe.

Cependant dans le cadre de notre étude l'élément le plus important réside dans le fait que les résultats moléculaires, parasitologiques et cliniques confirment la disparition des parasites 10 jours après le traitement .Les échantillons d'ARN recueillis le 10^{ème} jour constituant nos échantillons contrôles, il est absolument indispensable que ces échantillons représentent l'état physiologique normal du patient après traitement.

B. L'ANALYSE MICROARRAY :

En fonction de la méthode de filtrage statistique utilisée les gènes incriminés diffèrent. La plupart des gènes identifiés ont des fonctions inconnues et/ou n'ont pas été identifiés auparavant comme étant impliqués dans le paludisme. Certains qui ont des fonctions connues et classés selon l'ontologie génique (GO). Les gènes incriminés font état d'une implication claire du système immunitaire inné.

1. Comparaison des stades A et C par la méthode de filtrage ANOVA :

La 1^{ère} analyse de la variance (ANOVA) entre les données pour les échantillons de la phase aiguë de la maladie (A) et les échantillons provenant des mêmes patients guéris (C) identifiait un large nombre de gènes ayant une variation significative dans leur expression. Certains d'entre eux, classés selon l'ontologie génique sont très intéressants sur le plan immunitaire.

- Le gène **IFI30** (interféron gamma inductible protéin 30):

Ce gène apparaît être sur régulé en réponse à l'infection palustre. La protéine codée par ce gène est une réductase thiol lysosomale à pH bas. Elle réduit les ponts disulfures de protéines. Cette enzyme est exprimée constitutionnellement dans les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et est induite par l'interféron gamma dans d'autres types cellulaires. Cette enzyme joue un rôle important dans la présentation d'antigène par les molécules de classe II du CMH.

Les antigènes parasitaires libérés sont internalisés par les cellules présentatrices d'antigènes tels que les monocytes ou macrophages. Ils sont ensuite dépliés par cette enzyme par la réduction des ponts disulfures. Dégradés en peptides, ils se fixent aux molécules de classe II du CMH. Le complexe molécules de classe II du CMH - les peptides est ensuite transporté à la surface de la cellule où il stimule les cellules T CD4+ (Ping et *al.*, 2002).

Cette enzyme joue donc un rôle important dans l'initiation de la réponse adaptative de l'individu.

- CD63 melanoma antigen :

Ce gène code pour une glycoprotéine de surface cellulaire qui sert de médiateur dans les signaux de transduction. Elle joue un rôle dans la régulation, le développement, l'activation et la mobilité cellulaire. Cette protéine est également connue pour complexer avec les intégrines (Strausberg et *al.*, 2002). L'augmentation de l'expression de ce gène au moment de la phase aiguë de la maladie plaide en faveur d'une activation cellulaire en réponse au paludisme.

- Les composants cellulaires : la vacuole lytique et le lysosome

Nos résultats ont démontré une variation significative dans l'expression de gènes de composants cellulaires tels que la vacuole lytique et le lysosome. Ceux ci sont des éléments de la réponse immune innée non spécifique.

L'activation de ces composants cellulaires aboutit à la phagocytose de particules. Dans le cas du paludisme, il pourrait s'agir des débris cellulaires consécutifs à la rupture des schizontes ou d'antigènes parasitaires.

2. méthode de filtrage ANOVA par comparaison des stades A, B et C :

La deuxième analyse de la variance qui a pris cette fois en compte l'expression des gènes aux 3 stades a identifié un nombre de gènes plus restreint ayant une variation significative sur les 3 échantillons. Il a été observé entre autre une augmentation dans l'expression des gènes des récepteurs TLRs en l'occurrence le TLR2 et le TLR5 :

- TLR2 et Myeloid differentiation primary response gene (88):

Le TLR2 est un acteur de la réponse innée. L'augmentation de l'expression de ce gène au moment où le patient est malade indique que les antigènes malariques tels que le GPI pourraient activer ce récepteur (Krishnegowda *et al.*, 2004). La stimulation de ce récepteur entraîne le recrutement de la molécule MyD88 qui est une molécule adaptatrice impliquée dans la signalisation intracellulaire.

Les données que nous avons recueillies indiquent également une augmentation de l'expression du gène de MyD88.

La stimulation de ce récepteur aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B qui à son tour induit la production de cytokines pro inflammatoires telles que TNF- α . Il désormais admis depuis longtemps que TNF- α est impliqué dans la physiopathologie du paludisme en induisant l'apparition de la fièvre (Kwiatkowski.,1989) qui est par ailleurs un signe clinique décelé chez les patients inclus dans l'étude (Tableau 16).

De façon générale, il est aujourd'hui admis que les TLRs, membres de la famille des récepteurs IL1-R, jouent un rôle essentiel dans l'immunité innée mais aussi dans l'orientation de la réponse adaptative.

Nous avons observés dans nos résultats une augmentation de l'expression du gène de l'interféron gamma inducible par l'interféron gamma. L'interféron gamma est une cytokine qui est très importante pour l'activation des cellules. Elle provoque en outre une polarisation des lymphocytes vers le phénotype Th1. La réponse cellulaire de type Th1 aboutit à la production de cytokines pro inflammatoires, d'IL-12 et d'interféron gamma par contre les lymphocytes Th2 sont responsables de la production de cytokines anti inflammatoires, IL-4 et IL-10 (Donato Torre., 2002) . La réponse de type Th2 provoque la suppression de la réponse de type Th1.

- Toll-like receptor 5 :

Selon les données que nous avons recueillies le gène codant pour ce récepteur apparaît être sur régulé en réponse à la maladie. Bien que plusieurs TLRs aient déjà été identifiés comme activant la réponse immune innée au cours du paludisme, le rôle de TLR5 n'a pas été clairement défini. Cependant les TLRs sont capables de former des hétérodimères pour augmenter leur spectre de

reconnaissance. Des études plus poussées concernant ce récepteur devront être entreprises.

Cependant le TLR5 reconnaît les flagelles des bactéries gram positif et négatif, son activation entraîne la mobilisation du facteur nucléaire NF- κ B et stimule la production de TNF α (Fumitaka H *et al.*, 2001)

- T cell immune regulator 1 :

Cette protéine possède différentes fonctions. Cette enzyme régule l'acidification des organelles intracellulaires. Cette acidification est nécessaire pour beaucoup de processus biologique telle l'activation du zymogène, l'endocytose régulé par des récepteurs.

- Récepteur de faible affinité pour les IgG (Fc RIIC/ CD32) :

Selon la classification GO, ce gène code pour une protéine réceptrice des IgG impliquée dans la réponse immune. Elle est impliquée dans le processus de signalisation cellulaire. Jusqu'à présent seule L'implication du récepteur de faible affinité pour les IgE (Fce RII/CD23) avait été démontrée dans le neuropaludisme (Mazier *et al.*, 1999).

En outre si une réponse immunitaire spécifique humorale a déjà été montée par l'hôte humain, les particules parasitaires pourraient également être recouvertes d'IgG et être reconnues par les récepteurs de la portion Fc des immunoglobulines (Fc γ R) (Ravetch, 1997). A ce niveau également nous avons identifié le gène du Récepteur de faible affinité pour les IgG (Fc RIIC/ CD32) avec une augmentation au moment où les patients présentaient les symptômes cliniques spécifiques du paludisme.

3. Résultats de la comparaison de l'expression aux trois stades A et C avec un seuil de filtrage à 1,5 :

Dans cette dernière analyse seuls les gènes ayant une variation supérieure ou inférieure 1,5 ont été considérés.

A. Les gènes sur régulés :

- Mannose 6 phosphate receptor binding protein 1

Acteur de l'immunité innée, ce gène est sur régulé pendant la maladie.

Le mannose 6 phosphate receptor est une protéine lysosomale qui est impliquée dans les mécanismes de biosynthèse et de translocation cellulaire. Les deux fonctions de cette protéine sont liées à l'appareil de golgi ainsi qu'à la surface cellulaire où se fixent les protéines lysosomales et régulent le transport des lysosomes.

La réductase Interféron gamma protein inductible 30 qui a une expression augmentée est synthétisée sous forme d'une glycoprotéine précurseur soluble de 35 kDa qui est en majorité transporté via les récepteurs mannose 6 phosphate jusqu'aux sites de l'endocytose (Uyen T.Phan *et al.*, 2002).

- complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide :

Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide

Ce sont des éléments du complément, également acteur de l'immunité innée.

Les particules parasitaires à phagocyter peuvent avoir été recouvertes de molécules du complément qui seraient reconnues par les récepteurs sur le macrophage. Ce qui expliquerait pourquoi nous avons retrouvé les éléments du complément comme ayant une expression augmentée au moment de la phase aiguë de la maladie (Stade A).

- Transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)
C'est un facteur de transcription lymphoïde. L'activation de ce gène a été décrite comme critique dans l'évolution du cancer (Duval A *et al.*, 2000)
Par contre son rôle dans la réponse des individus face au paludisme n'est pas encore défini.

2.3.2 Les gènes sous régulés

- Interleukin 1 family, member 5 (delta) : IL1F5
La protéine codée par ce gène est un membre de la famille des cytokines Interleukine 1. Cette cytokine inhibe l'activation de NF- κ B induit par les membres 6 de la famille de l'interleukine 1.
- Interleukine 17F :
La protéine codée par ce gène est une cytokine qui est exprimée par les cellules T activées et stimule la production de plusieurs autres cytokines incluant IL-6, IL-8 et CSF2/GM-CSF. Cette cytokine est impliquée dans l'activation des MAP kinases (Hymowitz *et al.*, 2001).
- Zinc finger, FYVE domain containing 19 :
Ce gène code pour une protéine impliquée dans les phénomènes de régulation et de transcription de l'ADN (Strausberg RL *et al.*, 2002).
- Immunoglobulin mu binding protein 2 :
Elle est impliquée dans les processus de recombinaison, de réparation, de réplication de régulation de la transcription de l'ADN. Son activité est liée au noyau. (Strausberg RL *et al.*, 2002).

Parmi les gènes que nous avons identifiés, de nombreux gènes et mécanismes n'ont pas été identifiés comme ayant un rôle significatif dans la réponse immune de l'hôte face au paludisme. Ceci concerne la voie classique du complément et la voie de signalisation des récepteurs TLRs. De plus les gènes spécifiques impliqués dans chaque mécanisme différent souvent d'un patient à un autre et beaucoup de gènes ont des fonctions multiples.

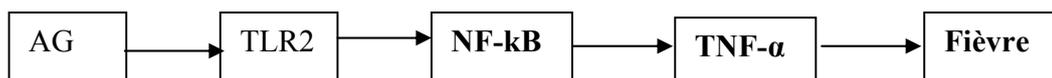
Ces résultats montrent qu'il est plus intéressant d'analyser l'implication d'ensembles de gènes et mécanismes plutôt que d'analyser des gènes spécifiques de façon individuelle.

Les gènes codant pour les éléments du cytosquelette tels que la β -actine, le Gapdh, les microtubules et les microfilaments ont été exprimés mais il n'y avait pas de variations significatives entre les 3 stades A, B et C ($p=0.38$ et 0.62) pour les méthodes de filtrage statistique utilisée, ce qui en sorte valide nos résultats car leur niveau d'expression ne doit pas varier.

Ces gènes codent pour des protéines constitutives de la cellule, leur expression n'est donc pas liée à l'état pathologique provoqué par le paludisme.

C Induction de l'expression des gènes humains :

Au regard de ces résultats, un schéma d'induction de l'expression de gènes à fonction connue par d'autres gènes dont le rôle dans le paludisme n'est pas clairement défini peut être proposé.



La technique de la PCR a permis de mettre en évidence la présence d'au moins un antigène parasitaire, en l'occurrence le gène de la protéine MSP1 de *Plasmodium falciparum*. Cette toxine seule ou probablement en association avec d'autres antigènes malariques pourrait être responsable de l'augmentation l'expression du gène du récepteur membranaire TLR2. Ce récepteur est un acteur du système immunitaire inné, son activation pourrait être la première réponse de l'organisme face à l'infection palustre.

L'expression du gène du récepteur TLR2 entrainerait à son tour le recrutement de NF-kB (ref). L'ensemble de ces mécanismes aboutirait à la production de TNF alpha.

TNF-alpha est qui un inducteur pyrogène dont les propriétés dans le paludisme ont été démontrées (Kwiatkowski, 1989) pourrait être responsable de la fièvre qui est justement le principal signe clinique observé.

**CONCLUSION ET
RECOMMANDATIONS:**

1. Conclusion :

Cette étude démontre la faisabilité de l'utilisation des microarrays pour identifier les changements dans l'expression génétique de sujets humains en réponse au paludisme. Ces résultats démontrent que l'influence des confusions liées aux variabilités interindividuelles peut être réduite par l'utilisation d'échantillons de contrôle provenant du même individu. Ces échantillons de contrôle représentant l'état physiologique normal, chaque individu est donc considéré comme son propre contrôle. Les résultats de cette analyse initiale indiquent que le paludisme induit une augmentation de l'expression des gènes identifiés et classés par l'Ontologie Génique (GO). Ces gènes sont impliqués dans la réponse immune, la réponse de défense, et la réponse au parasite.

La caractérisation des données par la méthode de filtrage ANOVA, utilisant seulement les échantillons de la phase aiguë (A) et ceux de guérison (C) de la maladie démontre qu'un large nombre de gènes sont sur ou sous exprimés chez tous les 6 patients. 536 gènes ont été identifiés comme ayant une variation statistiquement significative dans leur expression moyenne chez tous les 6 sujets avec une *p-valeur* = 0,005. Sur les 536 gènes 380 étaient sur régulés et 156 sous régulés. Quand les trois stades (A-B-C) sont considérés, le filtrage ANOVA a identifié 269 gènes qui sont exprimés dont 138 étaient sur régulés soit (51,3%) entre la phase aiguë (A et B) et la phase de guérison (C) chez tous les 6 sujets avec une variation significative ($P=0.005$) entre les différents prélèvements. Finalement, pour réduire l'impact des différences interindividuelles dans l'expression des gènes, seuls les gènes ayant une variation d'amplitude ≥ 1.5 dans l'expression (90% niveau de confiance) chez tous les sujets ont été considérés. Le filtrage a identifié 51 gènes avec une expression augmentée par rapport à l'état normal du patient et 58 avec une diminution de leur expression.

Cependant, beaucoup de ces gènes ont des fonctions inconnues ou dont l'implication dans la réponse de l'hôte face au paludisme n'est pas encore définit.

En résumé, ces données ont impliquées des gènes (tels les Toll-Like Receptors, TLRs) et des processus biologiques (telles l'activités des vacuoles lytiques et les lysosomes) dans la réponse humaine au paludisme. Ces données indiquent que la réponse humaine au paludisme pourrait est plus complexe que décrite précédemment.

Il faut rappeler que les microarrays permettent de détecter le niveau de transcription (ARNm) pas celui de traduction (protéines) ce qui signifie que le niveau d'analyse reste limité à l'expression des gènes mais pas aux produits d'expression des gènes.

Il est également important de rappeler que les niveaux d'ARNm peuvent ne pas refléter l'abondance des protéines qu'ils codent. La régulation post transcriptionnelle et les modifications post traductionnelles influencent fréquemment le niveau d'expression de la protéine biologiquement active.

2. Recommandations :

Au terme de cette étude nous formulons les recommandations suivantes :

- Faire une étude avec un échantillonnage assez grand pour identifier des profils d'expression génétiques similaires ;
- Tester ce type d'approche sur des populations différentes ;
- Coupler les études de microarrays avec des études de protéomique pour identifier également les protéines exprimées ;
- Tester des souches de *Plasmodium* avec des répertoires antigéniques différents pour identifier des profils d'expression génétique de l'hôte spécifique à chaque souche.

ANNEXES

1. PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE : à partir de confettis par le mini kit QIAamp[®] DNA (QIAGEN, Valencia, CA).

Ce protocole est applicable aussi bien aux échantillons traités ou non aux anticoagulants qui sont séchés sur du papier confetti.

Préparer d'abord des bains-marie de 85°C pour l'étape 2, 56°C pour l'étape 3 et 70°C pour l'étape 4. Les solutions de AW1 et AW2 doivent être préparées en accord avec le protocole. Si des précipités sont observés dans le tampon AL ou ATL, les dissoudre en les incubant à 56 °C. Toutes les centrifugations se feront à la température ambiante du laboratoire.

- a. Placer le papier confetti coupé en petits morceaux dans un tube eppendorf de 1,5 ml et ajouter 180 µl de tampon ATL.

NB: Nettoyer chaque fois le ciseau avec de l'éthanol à 70% si plusieurs échantillons doivent être traités.

- b. Incuber à 85°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement pour enlever les gouttes (provenant de l'évaporation du mélange papier confetti tampon ATL) qui sur le couvercle.

- c. Ajouter 20 µl de protéinase K. Mélanger en agitant et incuber à 56°C pendant 1 heure. Centrifuger rapidement pour enlever les gouttes du couvercle.

NB: l'addition de la protéinase K est essentielle.

- d. Ajouter 200 µl de tampon AL sur l'échantillon et mélanger en l'agitant, puis incuber à 70°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement. Pour une bonne lyse, il est essentiel de mélanger immédiatement et fortement l'échantillon et le tampon AL.

NB: Ne pas ajouter directement la solution de protéinase K sur la solution AL

Un précipité blanc peut se former quand le tampon AL est ajouté à l'échantillon.

Dans la plupart des cas les précipités se dissolvent durant la phase d'incubation.

- e. Ajouter 200 µl d'éthanol (96-100%) à l'échantillon, ce qui précipite l'ADN. Il faut mélanger fortement la solution en l'agitant, puis centrifuger à la vitesse maximale de 16400 rpm (Centrifugeuse eppendorf 5417R) pendant 1 seconde.
NB: Il est essentiel que l'échantillon et l'éthanol soient bien mélangés.
- f. Transférer prudemment la solution dans la colonne située dans un tube de 2 ml sans mouiller le bord. Fermer et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute. Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml et rejeter le filtrat.
- g. Ouvrir prudemment le couvercle de la colonne et ajouter 500 µl de tampon AW1 sans toucher le couvercle. Fermer et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute. Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml et rejeter le filtrat.
- h. Ouvrir prudemment le couvercle et ajouter 500 µl de tampon AW2 sans toucher la fermeture. Fermer et centrifuger à 14000 rpm (Centrifugeuse eppendorf 5417 R) pendant 3 minutes.
- i. Placer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml et centrifuger à 16400 rpm (Centrifugeuse eppendorf 5417 R) pendant 1 minute. Rejeter le filtrat.
- j. Placer la colonne dans un tube de 1,5 ml et ajouter 150 µl de tampon AE ou d'eau distillée. Laisser incuber à la température du laboratoire pendant 1 à 5 minutes et centrifuger à 8000 rpm pendant 1 minute.

NB: Ne pas faire l'éluat de l'ADN avec un volume < 100 µl. Le volume de l'éluat de ADN ne doit pas excéder 10 % pour la PCR (5 µl pour un volume réactionnel de 50 µl).

L'ADN peut être stocké à -20°C ou être utilisé directement pour la PCR.

2. PROTOCOLE D'ISOLATION D'ARN TOTAL :

Les échantillons ont été traités avec le kit RiboPure™-Blood (Ambion®). Tout travail sur les ARNs doit être effectué le plus stérilement possible à cause des RNases microbiennes. A cet effet en plus des règles de sécurité ordinaires au sein du Laboratoire, avant toute manipulation tous les matériels et accessoires ont été décontaminés systématiquement avec le RNase AWAY® (Invitrogen™), les gants ont été renouvelés fréquemment lors de la procédure.

2.1 LYSE DES CELLULES ET PURIFICATION INITIALE DE L'ARN :

2.1.1 Les échantillons stabilisés avec du RNA *later*® :

- a. Centrifuger l'échantillon stabilisé à 13200 rpm (centrifugeuse eppendorf 5415R) pendant 1 minute. Les cellules et les protéines plasmatiques formeront une large bande brune ou rouge-brun qui s'accumulera sur un côté du tube, et le surnageant peut être pâle, brun ou coloré (il peut être aussi souvent turbide) ;

- b. Enlever et rejeter tout le surnageant le versant ou par aspiration.

Pendant l'aspiration du surnageant, le fluide a été enlevé complètement y compris la portion située directement au dessus de la couche cellulaire. Celle ci peut être turbide et contenir des particules de matières blanches ;

notez que ces matières blanchâtres ne sont pas le 'buffy coat 'qui est la fraction observée après centrifugation de sang entier non traité sur tube avec anticoagulant. Si le surnageant est enlevé en versant, tapotez doucement le bord du tube inversé contre une serviette à papier pour enlever tout le fluide résiduel. Enlevez également tout le fluide résiduel à l'intérieur du capuchon du tube.

2.1.2 Lyser des cellules sanguines :

- a. Additionner 800 µl de solution de lyse et 50 µl d'acétate de sodium à la couche de cellules provenant des échantillons stabilisés avec le RNA *later*™;

- b. "vortexer" vigoureusement pour lyser les cellules (Vortex genie 2, Daigger®). Procéder à des inversions légères des tubes pour être sûr que la solution est homogène. Les échantillons stabilisés requièrent un "vortex" vigoureux pour la ré suspension des cellules.

2.1.3 Extraction :

- a. Additionner 500 µl d'Acide phénol/chloroforme, secouer vigoureusement pendant 30 secondes ;
- b. Laisser la mixture à la température ambiante pendant 5 minutes ;
- c. Centrifuger à la température ambiante pendant 1 min pour séparer la phase organique de la phase aqueuse. La phase aqueuse peut apparaître nuageuse ou claire après centrifugation ;

2.1.4 Récupération de la phase aqueuse :

- a. Transférer la phase aqueuse (en haut) contenant l'ARN dans un nouveau tube de 2 ml. Normalement la phase aqueuse a un volume compris entre 1 et 1,2 ml ;
- b. Eviter de prendre du matériel coloré provenant de la phase organique (en bas), qui contient l'hème et les protéines ;
- c. Rejeter la phase organique.

2.1.5 Additionner 600 µl d'éthanol absolu à chaque échantillon

A chaque tube de phase aqueuse récupéré après l'extraction avec l'acide phénol/chloroforme, additionner 600 µl d'éthanol absolu et "vortexer" brièvement mais vigoureusement pendant 1 seconde.

2.2 PURIFICATION FINALE DE L'ARN :

Avant de commencer :

- Additionner 56 ml d'éthanol à 100 % à la solution de lavage concentrée (Wash Solution 2/3) et bien mixer ;

- Chauffer un aliquote de solution d'éluion à 75° C dans un tube traité contre les RNases. Normalement chaque échantillon est élué dans environ 100 µl mais la solution d'éluion peut être augmentée pour éviter les pertes dues à l'évaporation.
- Assembler les filtres et les tubes. Pour chaque échantillon, placer un filtre dans un tube de collection

2.2.1 Faire passer 700 µl de la solution sur le filtre à la fois

- a. Appliquer 700 µl de l'échantillon (la phase aqueuse mixée avec l'éthanol) dans le filtre et centrifuger pendant 5 à 10 secondes pour faire passer le liquide à travers le filtre. Rejeter le filtrat et replacer le filtre dans le même tube ;
- b. Faire passer les 700 µl restants à travers le filtre et rejeter le filtrat.

2.2.2 Laver le filtre avec 700 µl de Solution de lavage 1 :

- a. Mettre 700 µl de la solution de lavage 1 (Wash Solution 1) dans le filtre et centrifuger pendant 5 à 10 secondes ;
- b. Rejeter le filtrat et replacer le filtre dans le même tube.

2.2.3 laver 2 x avec 700 µl de Solution de lavage 2/3 :

- a. Mettre 700 µl de la solution de lavage 2/3 (la solution de travail doit être préalablement mixée avec de l'éthanol) sur le filtre et centrifuger pendant 5 à 10 secondes. Rejeter le filtrat et replacer le filtre dans le même tube ;
- b. Répéter avec le second aliquote de 700 µl de la Solution de lavage 2/3 ;
- c. Après avoir rejeter la solution de lavage, replacer le filtre dans le même tube et centrifuger l'ensemble pendant 1 minute.

2.2.4 Eluer l'ARN avec 2 x50 µl de solution d'éluion préchauffée :

- a. Transférer le filtre dans un nouveau tube. Ajouter 50 µl de solution d'éluion au centre du filtre et fermer le couvercle. Laisser à la température ambiante pendant environ 20 secondes et centrifuger pendant 20 à 30 secondes à 13200 rpm (centrifugeuse Eppendorf 5417R) pour récupérer l'ARN ;
- b. Répéter l'opération avec 50 µl de solution d'éluion, collecter l'ARN dans le même tube après centrifugation pendant 1 min à 13200 rpm (centrifugeuse Eppendorf 5417R)
- c. Stocker l'ARN élué à -20° C ou à des températures plus basses.

2.3 TRAITEMENT A LA DNase I :

La digestion à la DNase I élimine les résidus d'ADN génomique de l'ARN extrait.

- a. Additionner 1/20 du volume 20 X DNase Buffer et 1 µl de DNase I (8 U/µl) à l'ARN et mixer légèrement mais entièrement.
Par exemple si l'ARN est élué dans 100 µl de solution d'éluion additionner 5 µl de DNase Buffer et 1 µl de DNase I ;
- b. Incuber pendant 30 minutes à 37°C avec un bain sec (Thermolyne, Type 17600);
- c. Utiliser un volume de réactif d'inactivation de la DNase I égale à 20% du volume d'ARN traité. Par exemple si 100 µl d'ARN sont traité avec de la DNase I, additionner 20 µl de réactif d'inactivation.
"Vortexer" le tube brièvement pour mixer entièrement le réactif d'inactivation avec l'ARN. Stocker l'échantillon à la température ambiante pendant 2 minutes. "Vortexer" le tube une ou deux fois pendant cette période pour ré suspendre le réactif d'inactivation de la DNase.
- d. Centrifuger l'échantillon à 13200 rpm (centrifugeuse Eppendorf 5417R) pendant 1 min pour éliminer le réactif d'inactivation de la DNase et transférer le surnageant (la solution d'ARN) dans un nouveau tube.

3 Electrophorèse d'ARN sur gel d'agarose :

- Préparation du gel d'agarose de 1% :
 - Peser 1g d'agarose pure (Ultra pure, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) grâce à une balance électronique (SATORIUS®) ;
 - Additionner 100 ml de TBE 0,5 X dans un erlen Meyer ;
 - Bien remuer pour **homogénéiser** la solution ;
 - Cuire le mélange pendant 1min 30 secondes dans un four à micro ondes à 100°C;
 - Laisser refroidir pendant 10 min ;
 - Assembler et niveler le moule ;
 - Ajouter 30 µl de bromure d'éthidium à 1mg/ml (Sigma®);
 - Couler le gel dans le moule et laisser polymériser pendant 15 minutes à la température ambiante.

- Dépôt et migration des produits amplifiés :
 - Placer le gel dans la cuve de migration (BIO-RAD) contenant la solution de migration : 700 ml de TBE 0,5 X (pH : 8,33) + 210 µl de bromure d'éthidium à 1mg/ml (Sigma®)
 - Mélanger 4 µL de marqueur moléculaire 0.24-9.5 kb RNA *ladder* (Invitrogen®), 10 µl d'ARN total chacun avec 3 µl de Colorant (bleu de bromophénol 0,25% Sucrose 40% dans de l'eau distillée) ;
 - Charger les puits du gel d'agarose avec l'ARN mixé avec le colorant ;
 - Lancer l'électrophorèse pendant 45 minutes à 100 volts (générateur Power PAC 200)

4 **Protocole de Lavage des échantillons d'ARN** avec le kit Rneasy®

Cleanup (QIAGEN)

Avant de commencer

- Ne pas dépasser la capacité de fixation (100 µg) pour une colonne (QIAamp spin column) ;
 - Le tampon RLT peut être sous forme précipitée consécutif à un stockage prolongé, si cela est nécessaire il faut le chauffer le redissoudre ;
 - Le β- mercaptoéthanol doit être additionné au tampon RLT. Avant toute utilisation additionnée 10 µl de β-ME pour 1 ml de tampon RLT. Le tampon RLT est stable pendant 1 mois après addition de β- mercaptoéthanol ;
 - Le tampon RPE est fourni sous forme concentrée. Avant de l'utiliser pour la première fois, additionner 4 volumes d'éthanol (96-100%) pour obtenir la solution de travail.
-
- a. Ajuster à 100 µl le volume de l'échantillon avec de l'eau traitée contre les ARNases et ajouter 350 µl de tampon RLT à l'échantillon .Mixer entièrement ;
 - b. Additionner 250 µl d'éthanol (96-100%) au lysat et mixer par pipetage. Ne pas centrifuger ;
 - c. Pipeter l'échantillon (environ 700 µl) dans la colonne (QIAamp spin Columbia) posée dans un tube de collection de 2 ml et centrifuger pendant 15 sec à $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10000 \text{ m}$) rejeter le résidu et le tube de collection ;
 - d. Placer la colonne dans un nouveau tube de collection de 2 ml et additionner 500 µl de tampon RPE et centrifuger pendant 15 secondes à $> 8,000 \times g$ ($> 10,000 \text{ m}$) rejeter le résidu et le tube de collection ;

- e. Ouvrir délicatement la colonne et additionner 500 µl de tampon RPE ; fermer le capuchon et centrifuger pendant 3 min à la vitesse maximale de 13200 m (centrifugeuse epidendrum 5415 R);
- f. Placer la colonne dans un nouveau tube de collection de 2 ml et rejeter l'ancien tube de collection ainsi que le filtrat. Centrifuger à la vitesse maximale de 13200 rpm pendant 1 min ;
- g. Transférer la colonne dans un nouveau tube de collection de 1.5 ml et pipeter 30 à 50 µl d'eau traitée contre les RNases (RNases free waters) directement sur la membrane du QIAamp.
Centrifuger pendant 1 min à $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) pour éluer, répéter l'opération avec 50 µl d'eau.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abel, L., Cot, M., Mulder, L., Carnevale, P., and Feingold, J. (1992). Segregation analysis detects a major gene controlling blood infection levels in human malaria. *Am J Hum Genet.* 50: 1308-17.
2. Aderem, A. and D. M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." *Annu Rev Immunol* 17(6): 593-623.
3. Aderem, A., R. J. Ulevitch, et al. (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." *Nature* 406(6797): 782-7
4. Anstey, N. M., Weinberg, J. B., Hassanali, M. Y., Mwaikambo, E. D., Manyenga, D., Misukonis, M. A., Arnelle, D. R., Hollis, D., McDonald, M. I., and Granger, D. L. (1996). Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med.* 184: 557-67.
5. Berendt, A. R., Simmons, D. L., Tansey, J., Newbold, C. I., and Marsh, K. (1989). Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for Plasmodium falciparum. *Nature.* 341: 57-9.
6. Blackman MJ, Waitt H, Holder MA. 1991. Processing of the P. falciparum major merozoite surface protein -1. Identification of a 33 kilos Dalton secondary processing product which is shed prior to erythrocyte invasion. *Mol. Biochem. Parasitol;* 49:35-44
7. Bustin SA & McKay IA 1999. The product of the primary response gene BRF1 inhibits the interaction between 14-3-3 proteins and cRaf-1 in the yeast trihybrid system. *DNA and Cell Biology* 18 653-661.
8. Certa U., Totmann D., Matile H., Reber LR. 1987. A naturally occurring gene encoding the major surface antigen precursor p190 of Plasmodium falciparum lacks tripeptide repeats. *EMBO J.*6: 4137-4142.
9. Cevayir Coban, Ken J. Ishii, Taro Kawai, Hiroaki Hemmi, Shintaro Sato, Satoshi Uematsu, Masahiro Yamamoto, Osamu Takeuchi, Sawako Itagaki, Nirbhay Kumar, Toshihiro Horii, and Shizuo Akira. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *Journal of Experimental Medicine.* January 28, 2005.

10. Clark, I. A., Rockett, K. A., and Cowden, W. B. (1992). Possible central role of nitric oxide in conditions clinically similar to cerebral malaria. *Lancet*. 340: 894-6.
11. Diawara S. (1997) hémoglobinopathie C et paludisme chez les enfants dans les services de pédiatrie du CHU de Gabriel Touré de Bamako. *Thèse, Med, Bamako*.
12. Dominique MAZIER, Josiane NITCHEU & Mariama IDRISSE-BOUBOU (2000). Cerebral malaria and immunogenetics**Parasite Immunology*,: 22: 613±623
13. Donato Torre, Filippo Speranza, Massimo Giola, Alberto Matteelli, Roberto Tambini, and Gilberto Biondi. (2002) Role of Th1 and Th2 Cytokines in Immune Response to Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*, Mar., p. 348–351
14. Doolan, D. L., and Hoffman, S. L. (1999). IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol*. 163: 884-92.
15. Doumbia. O. (1997) Paludisme au Mali, passé, présent et avenir. *Thèse, Med*.
16. Doumbo O, sangaré O, Touré YT. (1989).Le paludisme dans le sahel : l'exemple du Mali. *In Maladies Tropicales Transmissibles*, ed.Aupelf-Uref, 11-32.Paris.
17. Doumbo. O. (1992). Epidémiologie du paludisme au Mali. Etude de la chloroquino-resistance. Essai de stratégie de contrôle basée sur l'utilisation des rideaux imprégnés de perméthrine associé au traitement systématique des accès fébriles. *Thèse de Doctorat Sciences Biologiques (Parasitologie, Pathologie, Ecologie) Montpellier*.
18. Duval, A.; Rolland, S.; Tubacher, E.; Bui, H.; Thomas, G.; Hamelin, R. (2000). The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Res*. 60: 3872-3879.

19. Ferreira, A., Schofield, L., Enea, V., Schellekens, H., van, der, Meide, P., Collins, W. E., Nussenzweig, R. S., and Nussenzweig, V. (1986). Inhibition of development of exoerythrocytic forms of malaria parasites by gamma-interferon. *Science*. 232: 881-4.
20. Fumitaka Hayashi, Kelly D. Smith, Adrian Ozinsky, Thomas R. Hawn, Eugene C. Yi, David R. Goodlett², Jimmy K. Eng, Shizuo Akirak, David M. Underhill & Alan Aderem. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5 *NATURE* |VOL 410 | 26 APRIL 2001 |www.nature.com.
21. GeneChip[®] Expression Analysis *Technical Manual*. Affymetrix 1999-2003.
22. Grau, G. E., Fajardo, L. F., Piguet, P. F., Allet, B., Lambert, P. H., and Vassalli, P. (1987). Tumor necrosis factor (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. *Science*. 237: 1210-2.
23. Grau, G. E., Kindler, V., Piguet, P. F., Lambert, P. H., and Vassalli, P. (1988). Prevention of experimental cerebral malaria by anticytokine antibodies. Interleukin 3 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor are intermediates in increased tumor necrosis factor production and macrophage accumulation. *J Exp Med*. 168: 1499-504.
24. Grau, G. E., Taylor, T. E., Molyneux, M. E., Wirima, J. J., Vassalli, P., Hommel, M., and Lambert, P. H. (1989). Tumor necrosis factor and disease severity in children with *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 320: 1586-91.
25. Grau, G. E., Pointaire, P., Piguet, P. F., Vesin, C., Rosen, H., Stamenkovic, I., Takei, F., and Vassalli, P. (1991). Late administration of monoclonal antibody to leukocyte function- antigen 1 abrogates incipient murine cerebral malaria. *Eur J Immunol*. 21: 2265-7.
26. Haidara SA. (1989). Place du paludisme dans les syndrômes fébriles en Médecine interne de L'hôpital du Point G. *Thèse de Médecine, ENMP. BKO. Mali*.
27. Herrera, M. A., Rosero, F., Herrera, S., Caspers, P., Rotmann, D., Sinigaglia, F., and Certa, U. (1992). Protection against malaria in Aotus monkeys immunized with a recombinant blood-stage antigen fused to a universal T-cell

- epitope: correlation of serum gamma interferon levels with protection. *Infect Immun.* 60: 154-8.
28. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, Maruoka M, Mao W, Foster J, Kelley RF, Pan G, Gurney AL, de Vos AM, Starovasnik MA. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J.* 2001 Oct. 1; 20(19):5332-41.
 29. Jacobs, P., Radzioch, D., and Stevenson, M. M. (1996). A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun.* 64: 535-41.
 30. Janeway, C. A., Jr., R. Medzhitov, et al. (2002). "Innate immune recognition." *Annu Rev Immunol.* 20(2): 197-216.
 31. KAPLAN Jean Claude, DELPECH Marc. *Biologie moléculaire et médecine* .2^{ème} EDITION ;
 32. Kayentao. K. (1997). Epidémiologie du paludisme et évaluation du traitement de l'accès palustre simple à la chloroquine dans le village de Donéguébougou. *Thèse, Med, Bamako.*
 33. Ken Vernick, Wayne Xu . Introduction to Microarray Technology *Center for Microbial & Plant Genomics University of Minnesota St Paul, Minnesota, USA Minnesota Supercomputing Institute Center for Microbial & Plant Genomics University of Minnesota.*
 34. Knight, J. C., Udalova, I., Hill, A. V., Greenwood, B. M., Peshu, N., Marsh, K., and Kwiatkowski, D. (1999). A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet.* 22: 145-50.
 35. Koita O. (1988) .Contribution à l'étude de l'épidémiologie du paludisme le long de la route transsaharienne. *Thèse de Pharmacie, Bamako.*
 36. Koita O. (2000).Molecular studies of clonality transmission and severe malaria. *Thèse de PhD, Tulane University, New Orleans.*
 37. Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, Woods AS, Gowda DC.(2004). Induction of proinflammatory responses in

- macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem.* 2005 Mar 4; 280 (9):8606-16. Epub 2004 Dec 28.
38. Kumaratilake, L. M., Ferrante, A., and Rzepczyk, C. (1991). The role of T lymphocytes in immunity to *Plasmodium falciparum*. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN-gamma: comparisons with tumor necrosis factor effects. *J Immunol.* 146: 762-7.
 39. Kumaratilake, L. M., Ferrante, A., and Rzepczyk, C. (1991). The role of T lymphocytes in immunity to *Plasmodium falciparum*. Enhancement of neutrophil-mediated parasite killing by lymphotoxin and IFN-gamma: comparisons with tumor necrosis factor effects. *J Immunol.* 146: 762-7.
 40. Kumaratilake, L. M., Ferrante, A., and Rzepczyk, C. M. (1990). Tumor necrosis factor enhances neutrophil-mediated killing of *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun.* 58: 788-93.
 41. Kumaratilake, L. M., Ferrante, A., Jaeger, T., and Rzepczyk, C. M. (1992b). Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun.* 60: 3731-8.
 42. Kumaratilake, L. M., Rathjen, D. A., Mack, P., Widmer, F., Prasertsiroj, V., and Ferrante, A. (1995). A synthetic tumor necrosis factor-alpha agonist peptide enhances human polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Plasmodium falciparum* in vitro and suppresses *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *J Clin Invest.* 95: 2315-23.
 43. Kwiatkowski, D. (1989). Febrile temperatures can synchronize the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Exp Med.* 169: 357-61.
 44. Kwiatkowski, D. (1995). Malaria toxins and the regulation of parasite density. *Parasitology Today.* 11(6): 206-12.
 45. Kwiatkowski, D., Hill, A. V., Sambou, I., Twumasi, P., Castracane, J., Manogue, K. R., Cerami, A., Brewster, D. R., and Greenwood, B. M. (1990).

- TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*. 336: 1201-4.
46. Luty, A.J., Lell, B., Schmidt, O.R., Lehman, L.G., Luckner, D., Greve, B., Matousek, P., Herbich, K., Schmid, D., Migot, N.F., Deloron, P., Nussenzweig R.S., and Kremsner P. G (1999). Interferon-gamma responses are associated with resistance to infection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis*. 179: 980-8.
 47. Medzhitov, R., C. Janeway, Jr., et al. (2000). "Innate immunity." *N Engl J Med* 343(5): 338-44.
 48. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, et al. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* 388(6640): 394-7.
 49. Mellouk, S., Maheshwari, R. K., Rhodes, F. A., Beaudoin, R. L., Berbiguier, N., Matile, H., Miltgen, F., Landau, I., Pied, S., and Chigot, J. P. (1987). Inhibitory activity of interferons and interleukin 1 on the development of *Plasmodium falciparum* in human hepatocyte cultures. *J Immunol*. 139: 4192-5.
 50. Miller LH., Roberts T., Shahabudin M., McCutchan TF. 1993. Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1(MSP-1). *Mol. Biochem. Parasitol*, 59:1-14.
 51. Muzio, M., N. Polentarutti, et al. (2000). "Toll-like receptor family and signalling pathway." *Biochem Soc Trans* 28(5): 563-6.
 52. Ockenhouse, C. F., and Shear, H. L. (1984b). Oxidative killing of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium yoelii* by activated macrophages. *J Immunol*. 132: 424-31.
 53. Ockenhouse, C. F., Schulman, S., and Shear, H. L. (1984a). Induction of crisis forms in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by gamma-interferon-activated, monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 133: 1601-8
 54. Ockenhouse, C. F., Tegoshi, T., Maeno, Y., Benjamin, C., Ho, M., Kan, K. E., Thway, Y., Win, K., Aikawa, M., and Lobb, R. R. (1992). Human vascular endothelial cell adhesion receptors for *Plasmodium falciparum*-infected

- erythrocytes: roles for endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med.* 176: 1183-9.
55. Online. Available: <http://www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx>
 56. Orago, A. S., and Facer, C. A. (1993). Cytokine-induced inhibition of *Plasmodium falciparum* erythrocytic growth in vitro. *Clin Exp Immunol.* 91: 287-94.
 57. Payne D. (1988). Use and limitations of light microscopy for diagnosing malaria at the primary health care level. *Bull World Health Organ.* 1988; 66(5) :621-6.
 58. Parkin, J. and B. Cohen (2001). "An overview of the immune system." *Lancet* 357(9270): 1777-89.
 59. Peterson MG. Coppel RI. Maloney MB., Kemp DJ. 1988b. *Third form of the precursor to the major surface antigens of Plasmodium falciparum.* *Mol Cell. Biology* 8:2664-2667.
 60. Ping Li, M. Azizul Haque, and Janice S. Blum (2002). Role of Disulfide Bonds Epitope Selection1. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 2444–2450.
 61. Rapport ASACOBA de Banconi 2004
 62. R.A. Burt. (1999). Genetics of host response to malaria. *International Journal for Parasitology* 29(1999) 973-979
 63. Riley, E. M., Jakobsen, P. H., Allen, S. J., Wheeler, J. G., Bennett, S., Jepsen, S., and Greenwood, B. M. (1991b). Immune response to soluble exoantigens of *Plasmodium falciparum* may contribute to both pathogenesis and protection in clinical malaria: evidence from a longitudinal, prospective study of semi-immune African children. *Eur J Immunol.* 21: 1019-25.
 64. Rockett, K. A., Awburn, M. M., Aggarwal, B. B., Cowden, W. B., and Clark, I. A. (1992). In vivo induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infect Immun.* 60: 3725-30.

65. Rogier, C., Commenges, D., and Trape, J. F. (1996). Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. *Am J Trop Med Hyg.* 54: 613-9.
66. Sathit Pichyangkul, Kosol Yongvanitchit, Utaiwan Kum-arb, Hiroaki Hemmi, Shizuo Akira, Arthur M. Krieg, D. Gray Heppner,§ V. Ann Stewart,§ Hitoshi Hasegawa, Sornchai Looareesuwan, G. Dennis Shanks, and R. Scott Miller. (2004) Malaria Blood Stage Parasites Activate Human Plasmacytoid Dendritic Cells and Murine Dendritic Cells through a Toll-Like Receptor 9-Dependent Pathway. *The Journal of Immunology*, 2004, 172: 4926–4933.
67. Shai S, Blackman MJ, Holder AA. Epitopes in the 19kDa fragment of the *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein-1 (PfMSP-1(19)) recognized by human antibodies. *Parasitol Today.* 1994 May; 10 (5):182-4. *National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, UK.*
68. Stahl, P. D. and R. A. Ezekowitz (1998). "The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense." *Curr Opin Immunol* 10(1): 50-5.
69. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA (2002). Mammalian Gene Collection Program Team. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and

- mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 24; 99(26):16899-903. Epub 2002 Dec 11.
70. Tanabe K, Mackey M, Goman M, Scaife J. 1987. Allelic dimorphic in a surface antigen gene of *P. falciparum*. *J. Mol. Biol* 1987: 195: 253-287.
71. Taverne, J., Tavernier, J., Fiers, W., and Playfair, J. H. (1987). Recombinant tumour necrosis factor inhibits malaria parasites in vivo but not in vitro. *Clin Exp Immunol*. 67: 1-4.
72. Turner, G. D., Morrison, H., Jones, M., Davis, T. M., Looareesuwan, S., Buley, I. D., Gatter, K. C., Newbold, C. I., Pukritayakamee, S., and Nagachinta, B. (1994). An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. Evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol*. 145: 1057-69.
73. Uyen T. Phan, Rebecca L. Lackman, and Peter Cresswell .Role of the C-terminal propeptide in the activity and maturation of γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT) .*Published, JBC Papers in Press*, June 13, 2000, DOI 10.1074/jbc.M003459200
74. Westendorp, R. G., Langermans, J. A., Huizinga, T. W., Elouali, A. H., Verweij, C. L., Boomsma, D. I., Vandenbroucke, J. P., Vandenbroucke, JP\$[corrected, to, Vandenbroucke, and Jp] (1997). Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet*. 349: 170-3.
75. World health Organization 2002. The World Health Report 2003, Shapping the future: reducing risks, Promoting healthy Life. Geneva : World Health Organisation.
76. www.pasteur.fr/.../recherches-new-malaria.html.

FICHE SIGNALITIQUE**NOM** : CISSE**PRENOM** : Ousmane Hamadoun**TITRE DE LA THESE** : Analyse différentielle de l'expression génique de patients atteints de paludisme non compliqué par la technique de microarray**ANNEE ACADEMIQUE** : 2004-2005**PAYS D'ORIGINE** : Mali**LIEU DE DEPOT** : Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto-Stomatologie (FMPOS), Bamako, Mali.**SECTEUR D'INTERET** : Paludisme ; Génomique fonctionnelle

Les études utilisant la technologie des microarray peuvent fournir un aperçu complet de l'expression génétique des individus malades et sains. Cependant, l'interprétation des données de microarray humain est fréquemment compromise par la variabilité des résultats, les limitations dans la méthodologie de l'étude, ainsi que par l'inadéquation des éléments de contrôle. Pour pallier à ces difficultés dans une étude sur l'expression génétique au cours du paludisme, nous avons prélevé une série de 3 échantillons de sang pour isolation d'ARN et analyse microarray chez des individus ayant une infection symptomatique à *Plasmodium falciparum*. Le premier échantillon était pris au moment de la consultation initiale du malade (goutte épaisse positive, fièvre ou autres symptômes cliniques). Le deuxième échantillon était pris 3 jours plus tard (après 3 jours de traitement antipalustre). Le troisième et dernier échantillon était prélevé 10 jours après le traitement antipalustre, au moment où le malade est redevenu asymptomatique. Pour éviter les différences interindividuelles les trois échantillons provenaient du même individu. Les contrôles pour la variabilité de l'expérience incluaient l'usage de puces en double à chaque étape de la procédure, et l'élimination de données discordantes entre deux puces pour un même échantillon. L'expression des gènes du cytosquelette (Gene Ontology Classification) a été utilisée comme contrôle interne pour détecter les changements dans l'expression génétique des individus. En utilisant cette stratégie, nous avons examiné des changements dans l'expression génétique des enfants infectés. Les données fournies par les microarrays ont démontrées que le paludisme induisait des augmentations significatives dans l'expression des gènes groupés selon l'ontologie génique (classifications GO). Les gènes concernés étaient impliqués la réponse de défense immunitaire innée, la

réponse aux stimulus externes, la réponse au pathogène, la réponse immunitaire adaptative et la réponse au stress ($p=0,005$). Par contre, il n'y a pas eu de changements significatifs dans l'expression des gènes du cytosquelette ($p=0.38$ et 0.62).

Mots-clés: Paludisme, microarrays, expression génétique

SUMMARY**NAME:** CISSE**SURNAME:** Ousmane Hamadoun**TITLE OF THESIS:** Differential gene expression analysis by microarray of patients with uncomplicated malaria:**ACADEMIC YEAR:** 2004-2005**NATIVE COUNTRY:** Mali**PLACE OF DEPOSIT:** Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and Stomatologie of Bamako, Mali**FIELDS OF INTERESTS:** Human malaria; functional genomic

Microarray studies can provide a comprehensive picture of gene expression in both diseased and healthy individuals. However, the interpretation of human microarray data is frequently compromised by the variability of the results, by limitations in study design, and by inadequate baseline and control samples. To address these problems in a study of gene expression in malaria, we have taken 3 serial blood samples for RNA isolation and microarray analysis from individuals with symptomatic *Plasmodium falciparum* infection. The first sample is taken at the time of the patient's initial presentation (positive thick smear, fever or other symptoms or signs). The second sample is taken 3 days later (after 3 days of antimalarial treatment). The third is taken after finishing 3 days of oral treatment (10 days after presentation) when the patient has recovered and is again asymptomatic. Confounding by interindividual differences is controlled by using three samples from the same individual. Controls for assay variability include the use of duplicate chips at each time point, and the elimination of data for oligonucleotides that are discordant between the two chips. Confounding by changes in baseline gene expression is addressed by using the expression of cytoskeletal and cytoskeleton genes (Gene Ontology classification) as internal controls. Using this strategy, we examined changes in gene expression in children with malaria. Malaria produced significant increases in the expression of genes in the GO classifications for defense response, immune response, response to external stimuli, response to pathogen or parasite, innate immune response, and response to stress ($p=0,005$). In contrast, there were no significant changes in the expression of genes in the cytoskeleton or cytoskeleton organization/biogenesis GO classifications ($p=0.38$ and 0.62).

Keyword: malaria, microarray, gene expression

Serment

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.