

UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU
Faculté des Sciences et Techniques.
Centre de Recherches en Sciences
Biologiques Alimentaires et
Nutritionnelles (C.R.S.B.A.N)
BURKINA FASO



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE II.
Faculté des Sciences de Luminy.
Laboratoire d'ImmunoGénétique
Pharmacologie du paludisme
(EA 864), FRANCE

**ANALYSE DES BASES PHARMACOLOGIQUES ET
GENETIQUES DE LA RESISTANCE AU PALUDISME.**

THESE DE DOCTORAT DE SPECIALITE.

SCIENCES BIOLOGIQUES APPLIQUEES

Option : Biochimie et Microbiologie

Présenté par :

Brice Serge KUMULUNGUI

Président du Jury : Pr Maryvonne KOMBILA, Université Omar BONGO.

RAPPORTEURS : Pr François René TALL, Université de Ouagadougou.

: Pr Roland ROSSET, Université d'Aix-Marseille II.

Membres : Pr Francis FUMOUX, Université d'Aix-Marseille II.

Pr Alfred S. TRAORÉ, Université de Ouagadougou.

RECONNAISSANCE

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien financier de l'Agence Universitaire de la Francophonie (ex AUPELF-UREF), à travers le Contrat d'Association "Laboratoire Associé Francophone" n° 303.

Que Monsieur BOUTROS BOUTROS Ghali et Madame Michèle GENDREAU-MASSALOUX, respectivement Secrétaire Général de L'Organisation Internationale de la Francophonie (OIF) et Rectrice de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) trouvent ici, l'expression de notre profonde gratitude.

DEDICACE

Ce travail est dédié :

A ma mère.

A mon feu père.

A ma fiancée Fati Gado.

A mes futurs beaux-parents.

A mes frères et sœurs.

A mes oncles et tantes.

A mes cousins et cousines.

A tous mes amis et connaissances.

Aux étudiants et enseignants du Département de Biochimie et Microbiologie de l'Université de Ouagadougou.

A tous ceux qui souffrent et meurent de paludisme dans le monde.

REMERCIEMENTS

L'étude pharmacologique a été effectuée au Centre de Recherches en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles (C.R.S.B.A.N) de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Ouagadougou, en collaboration avec le Centre National de Lutte contre le Paludisme (C.N.L.P) au Burkina Faso, ainsi qu'avec la Faculté de Pharmacie (EA 864) de l'Université de la Méditerranée en France.

L'étude génétique a été effectuée au laboratoire d'ImmunoGénétique et Pharmacologie du Paludisme (EA 864) de la Faculté des Sciences de l'Université de la Méditerranée en France.

Qu' il me soit permis, d'exprimer mes sincères remerciements :

Au Professeur Alfred S. TRAORE, responsable du C.R.S.B.A.N. et directeur de cette thèse pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, m'avoir initié dans le domaine de la recherche, et pour m'avoir engagé dans la recherche sur le paludisme.

Au Professeur Francis FUMOUX, codirecteur de thèse et responsable du Laboratoire d'ImmunoGénétique et Pharmacologie du Paludisme (EA 864) de l'Université de la Méditerranée, pour m'avoir reçu deux fois de suite dans son laboratoire, m'avoir initié aux techniques de la biologie moléculaire, ainsi que pour son entière disponibilité.

Au Professeur Fluvio ESPOSITO du Centre National de Lutte contre le Paludisme (C.N.L.P.), pour m'avoir orienté dans l'élaboration des tests biologiques *in vitro*.

Au Professeur Odile NACOULMA, Chef du Département de Biochimie et Microbiologie pour ses conseils et suggestions.

Au Professeur Pascal RIHET du laboratoire d'ImmunoGénétique et Pharmacologie du Paludisme (EA 864) de l'Université de la Méditerranée pour son encadrement quotidien, ainsi que pour ses critiques et suggestions.

Aux Professeurs Pierre TIMON-DAVID et Monique GASQUET de la Faculté de Pharmacie (EA 864) de la Timone, pour m'avoir autorisé à réaliser des tests d'inhibitions dans leur laboratoire.

Au Professeur Augustin BERE, ainsi qu'à Madame et Monsieur Aboubacar S. OUATTARA, pour leurs critiques et suggestions.

A Monsieur C .A .T OUATTARA, pour son encadrement au cours de nos travaux de D.E.A.

A Christophe AUCAN et Agnès MARTINEAU de la Faculté des Sciences de Luminy, pour leur contribution à l'étude génétique.

Aux personnels techniques de soutien, en particulier Benoît ZOUNGRANA du C.N.L.P, Daouda et Abdul Aziz TRAORE du C.R.S.B.A.N, ainsi que Monsieur KINDA de l'I.R.S.N (Institut de Recherches sur les Substances Naturelles), pour leur contribution à l'étude pharmacologique.

Aux Professeurs François TALL et Roland ROSSET, pour avoir accepté d'instruire ce document en tant que Rapporteurs.

Au Président et aux Membres du jury, pour avoir accepté de venir juger ce travail.

A tous les étudiants et enseignants du C.R.S.B.A.N.

A tous mes collègues et amis de l'Université de Ouagadougou et de l'Université de la Méditerranée.

A toute ma famille, en particulier les professeurs Maryvonne et Pierre KOMBILA, Solange et Jacques EHOUMBA, Marie Joëlle MOULOUNGUÏ et Yves IKAPI, pour leur soutien moral et financier. Qu'ils trouvent ici, l'expression de ma plus profonde gratitude.

RESUME

Le paludisme dû à *Plasmodium falciparum* est un problème majeur de santé publique en Afrique au sud du Sahara. Le nombre d'accès palustres est estimé à plus de 300 millions par an et la mortalité, essentiellement infantile, se situe entre 1,7 et 2,4 millions d'individus. Afin d'apporter notre contribution dans la lutte contre cette affection, nous avons abordé notre étude sous deux volets de recherche.

Dans une première approche, nous avons tenté de mettre en évidence une activité schizontocide d'extraits naturels, alcaloïdes et tanins des feuilles et des racines de sept (7) plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso en particulier pour leur effet fébrifuge. Après caractérisation, extraction et dosage de ces groupes chimiques, il ressort des tests d'inhibition de croissance, que les alcaloïdes extraits des feuilles de *Mitragyna inermis* et de *Anogeissus leiocarpus*, ainsi que ceux extraits des racines de *Mitragyna inermis*, ont une excellente activité schizontocide sur les souches de *Plasmodium falciparum* en culture *in vitro* (CI50 < 5 µg/ml). Excepté les tanins extraits des feuilles et des racines de *Anogeissus leiocarpus*, qui présentent une bonne activité schizontocide (CI50 < 15 µg/ml), les tanins issus des autres plantes ne présentent aucun effet schizontocide. Aux concentrations d'extraits inhibant la croissance du parasite, nous avons montré que les alcaloïdes sont dépourvus de toxicité vis-à-vis des globules rouges, tandis que les tanins sont hémolytiques. Un tel résultat est d'une importance capitale quant à l'utilisation de ces plantes par les tradithérapeutes en vue de lutter contre le paludisme.

Dans une seconde approche qui est une étude génétique, nous avons analysé le polymorphisme de 10 marqueurs microsatellites du chromosome 5q31-33 dans une population rurale fortement exposée au paludisme à *Plasmodium falciparum*. Après analyse de ségrégation des allèles et vérification de la compatibilité entre les génotypes des enfants (les germains) et ceux de leurs parents, nous avons recherché l'existence d'une liaison génétique entre le phénotype "Charge Parasitaire Sanguine" et les 10 marqueurs microsatellites de la région 5q31-33. De cette étude, il ressort que le marqueur D5S636 semble lié au locus maladie pouvant contrôler le niveau d'infection à *Plasmodium falciparum* ($p = 0,042$). L'identification de ce locus, ouvrirait de nouvelles voies d'approches pour le développement de stratégies préventives et thérapeutiques du paludisme.

Mots clés : Paludisme, *Plasmodium falciparum*, alcaloïde, tanins, activité schizontocide, niveau d'infection, microsatellite, région 5q31-33.

SOMMAIRE

INTRODUCTION-----	1
-------------------	---

CHAPITRE I: DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I.1°) Cycle biologique des plasmodies-----	4
I.2°) Chimio-résistance des plasmodies-----	6
I.3°) Généralités sur les tanins et leurs propriétés biologiques-----	7
I.4°) Généralités sur les alcaloïdes et leurs propriétés biologiques-----	9
I.5°) Implication des facteurs génétiques de l'hôte au cours de la Résistance/Susceptibilité au paludisme-----	13
I.6°) La région chromosomique 5q31-33-----	14
I.7°) La technique d'amplification élective <i>in vitro</i> (PCR)-----	15
I.8°) Les ADN satellites-----	18

CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES

A) ETUDE PHARMACOLOGIQUE.

II.1°) Nature du matériel végétal-----	20
II.2°) Préparation des échantillons de poudre de feuilles et de racines-----	21
II.3°) Test qualitatif de mise en évidence des tanins-----	21
II.4°) Test qualitatif de mise en évidence des alcaloïdes-----	21
II.5°) Extraction des tanins totaux.-----	22
II.6°) Extraction des alcaloïdes totaux.-----	21

A°) ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES EXTRAITS VEGETAUX.

II.1°) Nature du matériel végétal

Nous avons travaillé avec sept (7) plantes médicinales, réparties dans les cinq (5) familles suivantes:

Familles	Noms scientifiques
1- <i>Caesalpinaceae</i>	- <i>Bauhinia rufescens</i> Lam. - <i>Cassia sieberiana</i> DC.
2- <i>Combretaceae</i>	- <i>Anogeissus leiocarpus</i> DC. (Guill. et Perr.)
3- <i>Meliaceae</i>	- <i>Trichilia roka</i> (Forsk., Chlov.)
4- <i>Mimosaceae</i>	- <i>Parkia biglobosa</i> . (Jacq., Benth.),
5- <i>Rubiaceae</i>	- <i>Mitragyna inermis</i> (Willd., O.Ktze) - <i>Nauclea latifolia</i> Sm..

Ces plantes sont utilisées en Afrique de l'Ouest par les tradithérapeutes pour le traitement des accès fébriles généralement liés à des accès palustres, mais aussi contre d'autres maladies infectieuses telles que la trypanosomiase, l'amibiase, l'onchocercose, la dysentérie etc.(Ake Assi & Guinko, 1991). Les remèdes phytothérapeutiques sont le plus souvent préparés suivant les pays, les régions, et

II.7°) Tests schizontocides <i>in vitro</i> , des extraits végétaux sur les souches de <i>Plasmodium falciparum</i> , prélevées sur individus infestés et sur la souche W2 de <i>Plasmodium falciparum</i> en culture continue-----	24
II.8°) Détermination des concentrations d'extraits végétaux à effets lytiques sur les hématies humains-----	29
II.9°) Chromatographie sur couche mince des extraits d'alcaloïdes totaux----	31

B) ETUDE GENETIQUE.

B.1) Approche épidémiologique.

II.10°) Caractéristiques de la zone d'étude-----	32
II.11°) Détermination de la charge parasitaire sanguine-----	33
II.12°) Facteurs pouvant influencer sur la parasitémie-----	34

B.2) Approche génétique.

II.13°) Prélèvement sanguin et isolement des PBMC-----	35
II.14°) Extraction de l'ADN-----	35
II.15°) Contrôle de la pureté de l'ADN-----	36
II.16°) Dosage spectrophotométrique de l'ADN-----	36
II.17°) Dosage fluorimétrique de l'ADN-----	37
II.18°) Contrôle de la qualité de l'ADN-----	38
II.19°) Amplification des régions microsatellites par PCR-----	38
II.20°) Séparation des fragments amplifiés sur gel de séquence-----	42

II.21°) Transfert des fragments d'ADN sur membrane de nylon-----	44
II.22°) Hybridation ADN/ Sonde polyAC-----	45
II.23°) Révélation -----	46
II.24°) Génotypage et contrôle des génotypes-----	47
II.25°) Les méthodes statistiques utilisées pour l'analyse de ségrégation et de liaison génétique au cours de l'infection palustre-----	48
II.25.1 Analyse de ségrégation-----	48
II.25.2 Analyse de liaison génétique-----	49

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

A°) ETUDE PHARMACOLOGIQUE

III.1°) Mise en évidence et dosage des tanins et des alcaloïdes contenus dans les plantes étudiées-----	51
III.2°) Tests schizontocides réalisés sur les cultures de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i> , prélevées chez les individus infestés-----	53
III.3°) Tests schizontocides réalisés sur les cultures continues de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i> -----	56
III.4°) Evaluation de l'activité hémolytique des extraits-----	57
III.5°) Chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits-----	62
Discussion-----	65

B°) ETUDE GENETIQUE

III.6°) Données épidémiologiques	68
III.7°) Extraction d'ADN à haute force ionique	70
III.8°) Contrôle de qualité de l'ADN	70
III.9°) Contrôle de la taille des fragments amplifiés	71
III.10°) Dosage spectrophotométrique et spectrofluorimétrique des ADN	74
III.11°) Génotypage	77
III.11.1 Ségrégation familiale des marqueurs microsatellites	81
III.11.2 Analyse de liaison génétique	84
Discussion	87
IV°) Conclusion générale et perspectives	90
V°) Références bibliographiques	92
Annexes	106

ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

alc : alcaloïde.

APS : Ammonium Persulfate.

AUF : Agence Universitaire de la Francophonie.

AUPELF / UREF : Association des Universités Partiellement ou Entièrement de
Langue Française / Universités des Réseaux d'Expression
Française.

BB : Bleu de Bromophénol.

BLB : Blood Lysis Buffer.

CD : Classe de Différenciation.

CI50 : Concentration Inhibant la croissance de 50% de parasites.

Conc DO : Concentration d'ADN obtenue par dosage spectrophotométrique.

Conc fluo : Concentration d'ADN obtenue par dosage fluorimétrique.

CoT : concentration X Temps.

CSF : Colony Stimulating Factor.

dATP : désoxyadénosine triphosphate.

dCTP : désoxycytidine triphosphate.

dGTP : désoxyguanosine triphosphate.

dNTP : désoxynucléoside triphosphate.

dTTP : désoxythymidine triphosphate.

DO : Densité Optique

DP : Densité Parasitaire.

EDTA : acide Ethylène Diamine Tétracétique.

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay.

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS ORALES.

Rihet P., Traoré Y., Aucan C., Traoré-Leroux T., Kumulungui B.S., Traoré A.S., Abel L & Fumoux F. (1999). Genetic dissection of *Plasmodium falciparum* blood infection levels and other complex traits related to human malaria infection. *Parassitologia*, **41** : 83-87.

Kumulungui B.S., Ouattara C.A.T., Esposito F., Fumoux F. & Traoré A.S. (1997). Etude de l'activité antiplasmodique des tanins et des alcaloïdes sur les souches de *Plasmodium falciparum in vitro*. Actes des III^{èmes} journées de Parasitologie, Ouagadougou, Burkina Faso.

Kumulungui B.S., Ouattara C.A.T., Fumoux F., Esposito F & Traoré A.S. (1998). Rôle pharmacodynamique des alcaloïdes et des tanins extraits des racines de *Mitragyna inermis* sur les cultures de *Plasmodium falciparum in vitro*. Société Ouest Africaine de Parasitologie, Dakar, Sénégal.

Kumulungui B.S., Sanon S., Ouattara C.A.T., Barro N., Fumoux F. & Traoré A.S. (1999). Etude comparative de l'activité hémolytique de quelques plantes utilisées dans le traitement du paludisme au Burkina Faso. Actes des V^{èmes} journées de Parasitologie, Ouagadougou, Burkina Faso.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le paludisme, affection parasitaire provoquée par les protozoaires du genre *Plasmodium* est un problème majeur de santé publique en Afrique au sud du Sahara. Ces micro-organismes infectent chaque année, selon l'OMS plus de 300 millions de personnes et en tuent entre 1,7 et 2,4 millions, essentiellement les enfants de moins de cinq ans (Butler & al., 1997). Cette situation est particulièrement inquiétante du fait de la large prédominance de *Plasmodium falciparum*, responsable du neuropaludisme (Voir annexe 3 p), de la persistance d'une forte endémicité, des difficultés rencontrées dans les programmes de contrôle du paludisme et surtout de l'apparition des chimio-résistances des plasmodies vis-à-vis des molécules antimalariques les plus couramment utilisés. Dans ces conditions, il devient nécessaire de mettre au point de nouveaux outils thérapeutiques permettant de réduire ces chiffres alarmants de mortalité et de morbidité palustre.

Dans une première approche, nous nous sommes intéressés à l'exploitation rationnelle de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso, comme source potentielle de nouvelles molécules antimalariques. C'est ainsi que nous avons recherché l'activité schizontocide d'extraits naturels de plusieurs plantes (alcaloïdes et tanins) sur les souches de *Plasmodium falciparum* en culture *in vitro* et avons déterminé leurs effets hémolytiques. Cette étude pharmacologique, est une contribution à la connaissance des propriétés médicinales des plantes traditionnelles utilisées dans le traitement du paludisme, afin d'impulser une utilisation plus rationnelle de ces plantes par les tradithérapeutes. L'isolement des groupes chimiques par extraction organique, vise à identifier de nouvelles molécules antimalariques actives sur les souches de *Plasmodium falciparum*.

Dans une seconde approche, nous nous sommes orientés vers la localisation des facteurs génétiques de l'hôte impliqués dans le contrôle de la susceptibilité/résistance au paludisme.

Plusieurs études antérieures sont en faveur du contrôle génétique du paludisme aussi bien dans les modèles animaux (Stevenson & *al.*, 1992 ; Fortin, 1997) que chez l'homme (Miller, 1994 ; Hill, 1996). Plus récemment, notre équipe (Rihet & *al.*, 1998 et 1999) a mis en évidence l'existence d'un fort effet génétique du niveau d'infection palustre dans une population de la ville de Bobo Dioulasso au sud ouest du Burkina Faso, faiblement exposé au paludisme (30 à 35 piqûres infestantes par personne et par an.). De cette étude, il ressort une forte liaison génétique entre le phénotype "charge parasitaire sanguine" et deux marqueurs microsatellites D5S393 et D5S658 ($p < 0,004$) situés dans la région 5q31-33 du chromosome 5. Notre étude a pour objectif principal, de rechercher dans une zone rurale fortement exposée au vecteur du paludisme (230 piqûres infestantes par personne et par an.) l'existence des composantes génétiques pouvant influencer sur le niveau d'infection palustre. Pour cela, nous avons analysé le polymorphisme de dix (10) marqueurs microsatellites de la région 5q31-33 dans cette population fortement exposée au paludisme et avons procédé à une analyse de liaison génétique entre le phénotype "charge parasitaire sanguine" et les dix marqueurs génétiques de la région 5q31-33. L'intérêt de cette région chromosomique repose sur le fait qu'elle renferme plusieurs gènes candidats intervenant dans la régulation de la réponse immunitaire protectrice (Taylor-Robinson & *al.*, 1993) et dans la physiopathologie de plusieurs maladies.

La localisation et l'identification fine des gènes contrôlant le niveau d'infection palustre, pourraient conduire à identifier les individus à risque vers qui, des mesures préventives et thérapeutiques devraient être dirigées en priorité.

De plus, les connaissances acquises dans le domaine du contrôle génétique des maladies infectieuses seront d'un intérêt majeur pour le développement d'un vaccin et la découverte de nouveaux traitements pouvant permettre de compenser les déficits génétiques éventuels (Chevrier & *al.*, 1992).

I.1°) Cycle biologique des plasmodies.

Au cours d'une piqûre infestante, l'anophèle femelle injecte avec sa salive et dans un vaisseau sanguin la quasi totalité des sporozoïtes contenus dans ses glandes salivaires. Ces éléments filiformes se répartissent rapidement dans tout l'organisme et ceux qui gagneront le foie poursuivront leur cycle de développement (Figure 1).

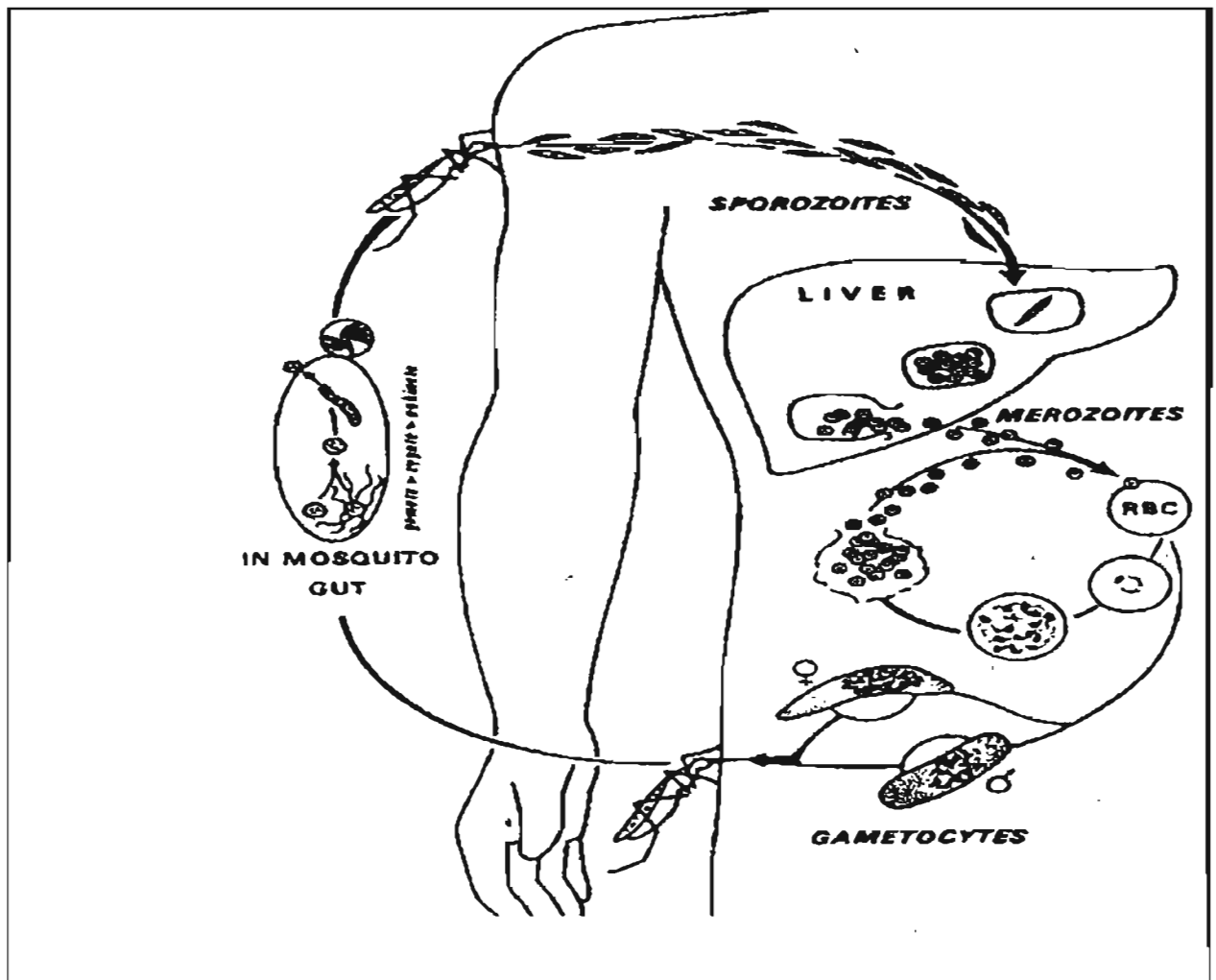


Figure 1 : Schéma du cycle évolutif des Plasmodies.

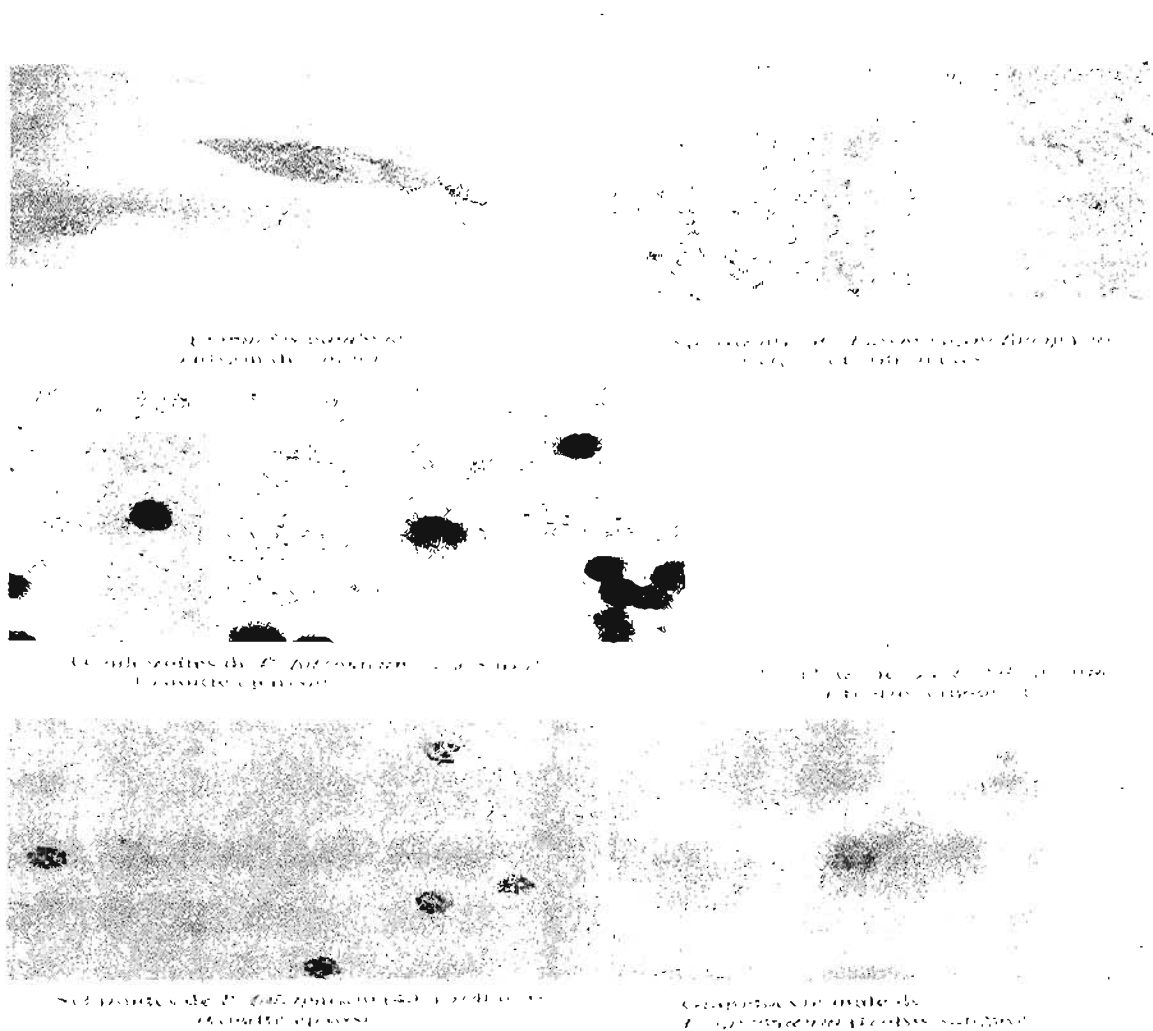


Figure 2 : Différentes formes asexuées du cycle de *P. falciparum*.

1.2°) Chimio-résistance des plasmodies

Parmi les quatre espèces infestant l'homme, seul *P. falciparum* montre une capacité à acquérir une résistance vis-à-vis des schizontocides sanguins. (Carme, 1991 ; Guiguemde & al., 1992 ; Le Bras & al., 1992). Plusieurs mécanismes de résistance des plasmodies vis-à-vis des antimalariques ont été mis en évidence. La résistance aux antifoliniques (pyriméthamine et cycloguanil), proviendrait d'une mutation ponctuelle, souvent unique sur le gène de la dihydrofolate réductase

également une inhibition de croissance *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, mais il présente des effets toxiques (Nkunya, 1992).

De nombreux travaux, montrent que certains microorganismes semblent dégrader les tanins (Lewis & Starkey, 1969). Ainsi, les bactéries appartenant aux genres *Bacillus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Cytophaga* etc., dégradent les tanins (Deschamps, 1985), de même que les champignons appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* peuvent dégrader les tanins (Chandra & al., 1973 ; Grand & al., 1976). Plus récemment encore, nous avons présenté au cours d'une communication orale faite à Dakar, des résultats préliminaires sur une éventuelle biodégradation des tanins par *Plasmodium falciparum* (Kumulungui & al., 1998). Le suivi de la cinétique de disparition des tanins ainsi que l'analyse des produits du métabolisme, nous permettrons de confirmer ce résultat.

1.4°) Généralités sur les alcaloïdes et leurs propriétés biologiques.

Les alcaloïdes sont des composés organiques, d'origine végétale ayant un poids moléculaire compris entre 100 et 900. Ils renferment un atome d'azote inclus dans un système hétérocyclique, les rendant plus ou moins basiques selon la disponibilité du doublet libre de l'azote. D'origine naturelle et de distribution restreinte, ces composés sont doués, à faible dose de propriétés pharmacologiques marquées. L'alcalinité des alcaloïdes permet de former des sels avec des acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates,...) ou organiques (tartrates, sulfamates, maléates,...). Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués et sont, sauf rares exceptions, insolubles dans les solvants organiques. Les sels cristallisés se conservant plutôt bien, ils constituent la forme commerciale habituelle pour ces molécules. La biosynthèse

des alcaloïdes est connue notamment grâce à l'emploi d'éléments marqués. Le précurseur biosynthétique des alcaloïdes est généralement un acide aminé. Sur le plan pharmacologique, des travaux beaucoup plus anciens, ont montré que des alcaloïdes interviennent au niveau du système nerveux central, comme dépresseurs (exemple: la morphine, Derosne, 1803 ; Serturmer, 1806) ou stimulants (exemple: caféine et strychnine, Pelletier & Caventou, 1817 à 1820). Ces deux derniers ont découvert par la suite des molécules antipaludiques (quinine et cinchonine) et un amoebicide (émétine). D'autres auteurs, ont montré que les alcaloïdes interviennent aussi au niveau du système nerveux autonome comme sympathomimétiques (éphédrine), sympatholytiques (yohimbine), parasympathomimétiques (ésérine, pilocarpine), anticholinergiques (atropine, hyoscyamine), ou ganglioplégiques (spartéine, nicotine).

Suite à l'émergence des chimio-résistances des souches de *Plasmodium falciparum* à la plupart des antimalariques de synthèse, les chercheurs, particulièrement ceux des pays en voie de développement où le paludisme est endémique, portent un intérêt particulier aux plantes utilisées en médecine traditionnelle, comme sources potentielles de nouveaux principes actifs dotés d'immenses propriétés thérapeutiques. Dans cet ordre d'idées, la tétrandrine isolée chez *Stephania tetrandra*, longtemps utilisée dans la médecine chinoise et ayant une structure proche de celle des amino-4 et amino-8 quinoléines, s'est avérée efficace *in vitro* sur les souches chloroquino-résistantes de *Plasmodium falciparum*. (Ye & Van Dyke, 1989). L'artémisinine ou quinghaosu, isolée en 1971 par des chimistes chinois à partir d'extraits de feuilles de *Artemisia annua*, s'est aussi avérée efficace sur les souches résistantes de *Plasmodium falciparum* (Bougnoux & Ancelle, 1993 ; Kirby, 1996 ; Meshnick, 1996). Il en est de même pour la pyronaridine, utilisée dans la pharmacopée chinoise, qui est très efficace sur les

souches chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* au Cameroun aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Ringwald & al., 1996). Plusieurs autres alcaloïdes se sont avérés être potentialisateur de l'activité de la chloroquine (Ratsimamanga-Urverg & al., 1994 ; Rasoanaïvo & al., 1998), notamment la malagashanine (Caira & Rasoanaïvo, 1995).

Outre le rôle antiparasitaire des alcaloïdes, l'activité antimicrobienne et antifongique de ces composés a été clairement démontrée. Certains parmi eux, sont des inhibiteurs de la croissance des bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*...), Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*...) et antifongiques (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*...).(Millogo, 1992 ; kirby, 1996 et Valsaraj, 1997).

Ces différentes activités conduisent à une utilisation importante des drogues à alcaloïdes et justifient l'intérêt porté à l'étude de ces molécules. Les structures chimiques de quelques molécules antipaludiques d'origine végétale sont représentées dans la figure 3.

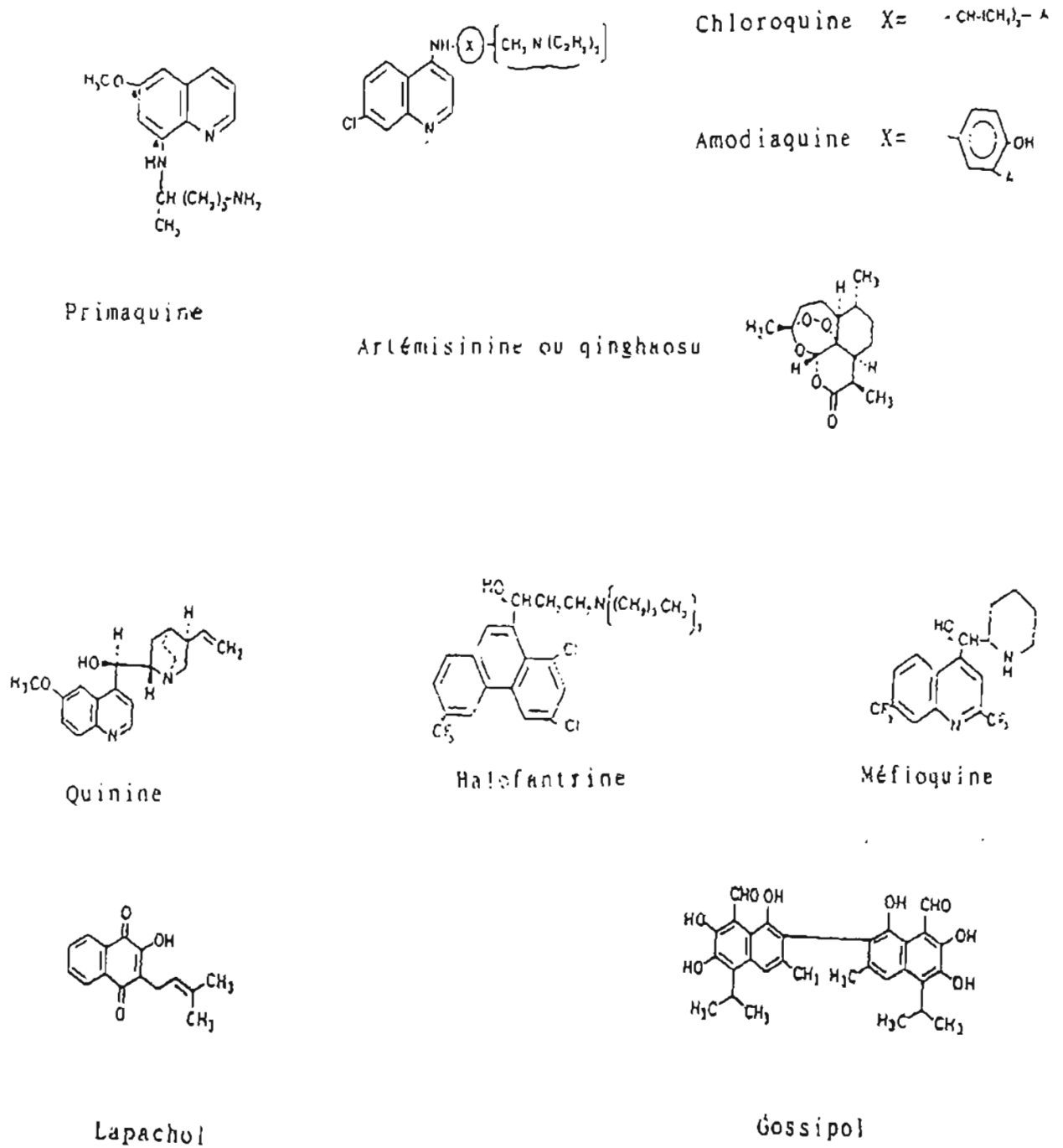


Figure 3 : Structures chimiques de quelques molécules antipaludiques.

1.5°) Implication des facteurs génétiques de l'hôte au cours de la Résistance/Susceptibilité au paludisme.

L'évolution d'une infection palustre fait intervenir plusieurs facteurs notamment des facteurs du milieu (niveau d'exposition, densité des vecteurs, climat etc.) (Robert, 1986 ; Trape & *al.*, 1987 ; Gazin & *al.*, 1987 et 1988), des facteurs liés à la virulence du parasite (Gupta & *al.*, 1994 ; Mendis & Carter, 1995), des facteurs liés au potentiel génétique de l'hôte, à l'âge des sujets (Cot & *al.*, 1993 ; Baird, 1995 et 1998 ; Traore & *al.*, 1999), ainsi que des facteurs liés à la réponse immunitaire protectrice (Ferrante & *al.*, 1990 ; Astagneau & *al.*, 1991 ; Naotunne & *al.*, 1991 ; De Kossodo & *al.*, 1993 ; Picot & *al.*, 1993 etc.). Le rôle des facteurs génétiques de l'hôte dans le contrôle de l'infection a été clairement démontré dans des modèles animaux, en particulier dans les modèles murins (Stevenson & *al.*, 1982 ; Fortin, 1997 ; Foote, 1997). Un criblage systématique du génôme a ainsi permis la localisation du locus de susceptibilité à *P.chabaudi* sur le chromosome 8. Chez l'homme, de nombreux résultats sont également en faveur d'un contrôle génétique de la susceptibilité/résistance au paludisme (Miller, 1994 ; Hill, 1996 ;). Des études de type cas-témoins ont permis d'identifier au niveau de certains gènes des variants conférant une résistance ou une susceptibilité accrues aux formes graves du paludisme. Plusieurs gènes ont ainsi été associés aux formes graves. Ce sont essentiellement des gènes impliqués dans la structure ou le métabolisme des globules rouges (Nagel & *al.*, 1989 ; Ruwende & *al.*, 1995), des gènes impliqués dans le contrôle de la drépanocytose (Carnevale & *al.*, 1981) et des gènes des classes I, II et III appartenant au locus du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Hill & *al.*, 1991 ; Mc Guire & *al.*, 1994). L'importance réelle de ces gènes dans la population humaine est mal connue, en particulier de telles associations n'ont été retrouvées ni avec les accès palustres simples, ni avec la charge

parasitaire sanguine. Les processus conduisant aux phénomènes pathologiques sont insuffisamment compris quoiqu'il soit établi qu'une charge parasitaire sanguine importante joue un rôle déterminant dans l'apparition des accès palustres (Trape, 1985). Une meilleure connaissance du contrôle génétique de la charge parasitaire sanguine est donc primordial. Par ailleurs, d'autres études ont montré le rôle des facteurs génétiques dans le contrôle de la réponse immune à certains antigènes de *P. falciparum* (Pattaroyo & al., 1991 ; Jepson & al., 1997). C'est ainsi que chez les jumeaux, les taux d'anticorps présentent une meilleure concordance chez les jumeaux monozygotes que chez les dizygotes (Sjöberg & al., 1992 ; Jepson & al., 1995).

1.6°) La région chromosomique 5q31-33.

La région 5q31-33 renferme plusieurs gènes candidats intervenant dans la régulation de la réponse immunitaire contre les plasmodies (Figure 4), notamment des gènes codant pour les cytokines, des facteurs de croissance, des récepteurs cellulaires (Chandrasekharappa & al., 1990 ; Saltman & al., 1993).

Gènes candidats

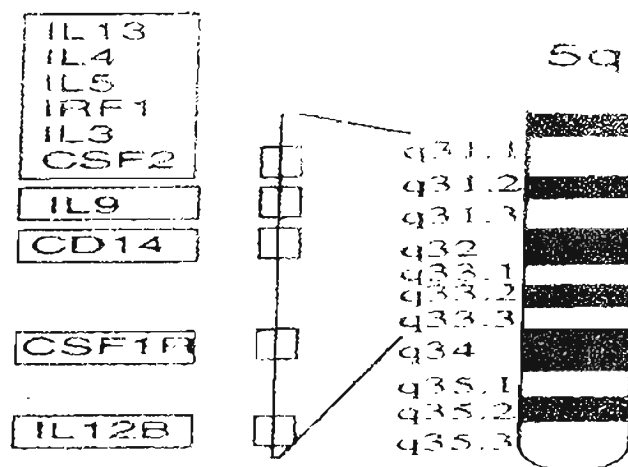


Figure 4 : région 5q31-33 et les principaux gènes candidats.

Des gènes régulant la balance des lymphocytes T auxiliaires Th1 et Th2 tels que les gènes de l'IL-4 et de l'IL-12 et des facteurs régulant l'interféron 1 ou IRF1 (Abbas & *al.*, 1996). On sait par ailleurs que la production des anticorps contre *Plasmodium falciparum* est sous le contrôle de l'IL-4 (Troye-Blomberg & *al.*, 1990 ; Bouharoun-Tayoun & *al.*, 1995), et que l'injection d'IL-12 recombinante confère une protection stérilisante contre *P. cynomolgi* chez le singe (Hoffman & *al.*, 1997). Dans cette région 5q31-33, a été également localisé le gène codant pour l'IL-9, impliqué dans le contrôle de la susceptibilité à l'asthme (Postma & *al.*, 1995 ; Nicolaïdes & *al.*, 1997), dans les hyperéosinophilies, dans le contrôle du taux d'IgE sériques (Marsh & *al.*, 1994; Meyers & *al.*, 1994), ainsi que dans le contrôle du niveau d'infection à *Schistosoma mansoni* (Marquet & *al.*, 1996 ; Müller & *al.*, 1997) et à *Plasmodium falciparum* (Rihet & *al.*, 1998).

1.7°) La technique d'amplification sélective *in vitro* (PCR).

La polymérase Chain Reaction (PCR), est une technique d'amplification génique qui permet de synthétiser des copies multiples d'une matrice donnée à l'aide d'amorces spécifiques, sans avoir à renouveler l'enzyme après dénaturation de l'ADN (Mullis & *al.*, 1987).

La PCR nécessite deux outils de base (amorces spécifiques et l'ADN polymérase) et un protocole expérimental approprié. Le principe de la méthode est le suivant : deux oligonucléotides complémentaires d'une courte séquence située aux extrémités 5'Phosphate des brins du fragment d'ADN à amplifier sont mis à hybrider avec le fragment. Les extrémités 3' OH libre des oligonucléotides servent d'amorce à une ADN polymérase, chaque brin du fragment sert alors de matrice à l'enzyme qui synthétise les brins complémentaires, le facteur de multiplication est alors de deux. Les produits issus de ce premier cycle sont dénaturés par la chaleur

et les oligonucléotides ou primers sont à nouveau remis à hybrider avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque brin servant de matrice à l'ADN polymérase. Le facteur d'amplification sera alors de quatre. On obtient ainsi un doublement des copies du fragment d'ADN à chaque cycle. Pour 30 cycles, le facteur d'amplification pourrait atteindre 10^9 . Le principe est illustré sur la figure 5.

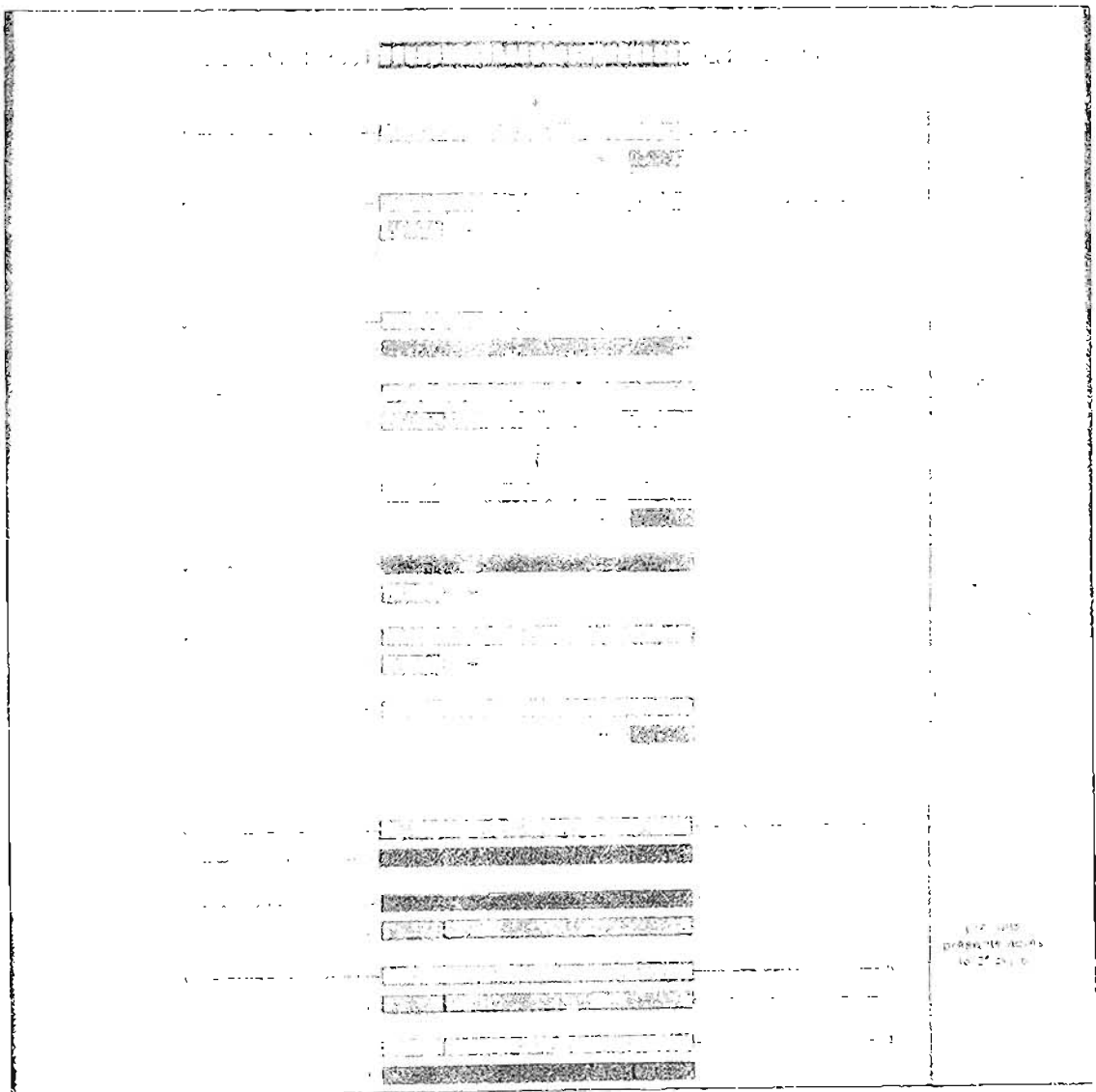


Figure 5 : Amplification des fragments d'ADN par PCR.

L'emploi d'une polymérase thermostable, la Taq polymérase, isolée de la bactérie *Thermus aquaticus*, a permis de développer des thermocycleurs automatiques (dénaturation / hybridation / élongation), rendant plus aisé l'emploi routinier de la PCR. (Saiki & al., 1988). De part sa relative facilité d'emploi, le formidable taux d'amplification et la spécificité de la polymérisation, cette technique s'est répandue dans la plupart des laboratoires de biologie moléculaire pour des applications au clonage des gènes de séquences connues ou non, à la mutagenèse et au séquençage.

Derrière sa très grande simplicité, à la fois dans le principe et dans la réalisation, se cachent de nombreux problèmes susceptibles d'entacher la valeur des résultats obtenus. Le principal écueil étant la contamination par des amorces non spécifiques. La solution la plus efficace à prendre pour lutter contre les contaminations consiste à réaliser les incubations dans un laboratoire différent et le plus éloigné possible de celui où sera analysé le produit amplifié. Le matériel utilisé pour réaliser les incubations ne doit jamais quitter le laboratoire correspondant. Il est impératif de respecter rigoureusement le protocole d'amplification.

La seconde limite de la technique PCR repose sur le manque de fidélité de la Taq polymérase. En effet, cet enzyme ne possède pas d'activité de correction des épreuves. Le taux d'erreurs introduit par cette enzyme est élevé (10^{-5}), pouvant altérer les résultats obtenus.

La troisième limite est liée à la présence d'amplifications parasites, dues aux mauvaises conditions d'hybridations des amorces. Pour y remédier, le moyen le plus efficace est d'augmenter la stringence du milieu en augmentant par exemple la température jusqu'à ce que les bandes contaminantes disparaissent. Une autre solution consiste à utiliser la technique du "hot start". Le principe de cette variante de la technique PCR est d'ajouter la Taq polymérase après la première étape de

dénaturation, suffisamment pour que le mélange d'incubation n'ait pas le temps de se refroidir, ce qui permet une dénaturation plus efficace, augmentant ainsi la spécificité de la réaction et donc diminuant considérablement les risques d'amplifications parasites.

1.8°) Les ADN satellites.

Lorsque l'on étudie la cinétique de réassociation des brins de l'ADN préalablement séparés par une élévation de la température au-dessus de la température de fusion (T_m) de cet ADN, on obtient une courbe sigmoïde presque parfaite avec l'ADN des procaryotes indiquant que la vitesse de réassociation de toutes les séquences est la même, donc qu'elles ne sont pas répétées. Avec l'ADN de mammifère, la cinétique de réassociation est une courbe complexe résultant de la superposition de plusieurs courbes sigmoïdes (Figure 6).

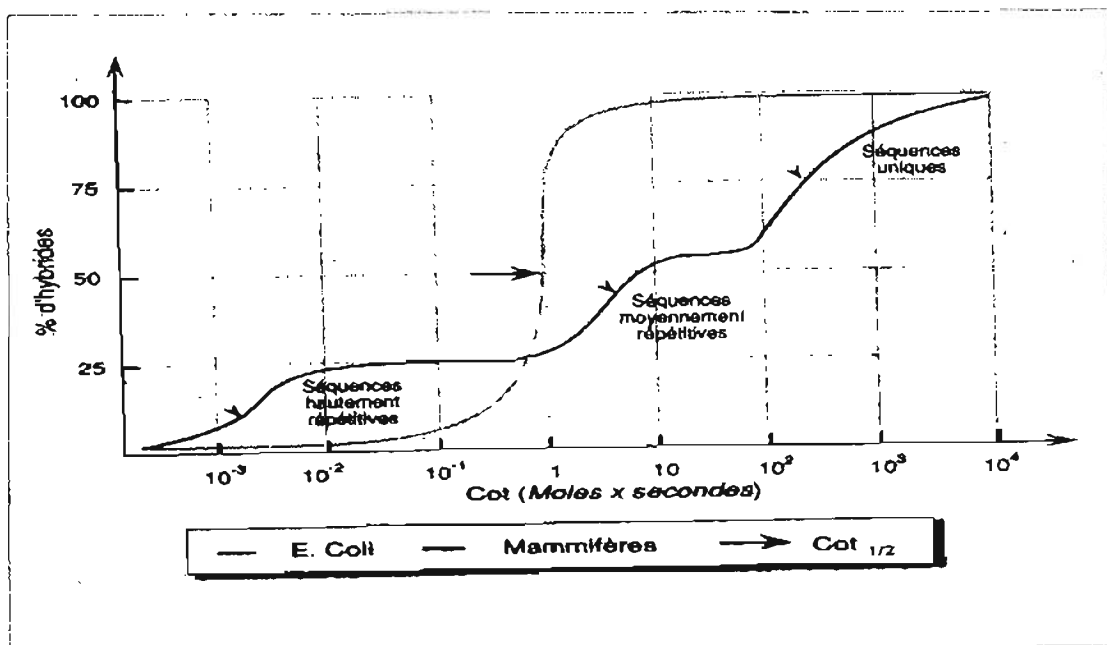


Figure 6 : Cinétique de réassociation de l'ADN.

En analysant la courbe complexe, on observe 3 types de cinétique de réassociation : un ADN se réassociant quasi immédiatement ($Cot < 0,01$ mole x seconde), correspond donc à de l'ADN hautement répétitif (tandem repeat) présent en un très grand nombre de copies. Un ADN se réassociant qu'un peu plus lentement ($0,01 < Cot < 10$), correspond à de l'ADN moyennement répétitif, et un ADN ne se réassociant que très lentement ($10 < Cot < 10000$), correspond pour les Cot les plus élevés à des séquences uniques. (Hardman & *al.*, 1986). Le premier groupe d'ADN à réassociation très rapide, correspond à l'ADN satellite que l'on peut identifier après centrifugation sur gradient de Chlorure de césium, il représente 10 à 15% du génôme des mammifères, il n'est pas codant. Les microsatellites sont de courtes séquences nucléotidiques répétés en tandem et où le motif de base est très court, généralement de type $(AC)_n/(GT)_n$ répété plusieurs fois et uniformément distribués sur l'ensemble du génôme. Très polymorphes et hautement informatif, les microsatellites constituent avec l'introduction de la technique PCR un outil puissant pour l'analyse du génôme humain (Litt & Luty, 1989 ; Hearne & *al.*, 1992 ; Dib & *al.*, 1996). En plaçant des amorces dans les régions flanquant les microsatellites qui sont uniques et caractéristiques d'un locus donné, il est possible de l'amplifier par PCR et d'analyser les produits de la réaction dans un système électrophorétique suffisamment discriminatif pour permettre de distinguer des variations d'un nucléotide.

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES

alcaloïdes bases ainsi obtenus sont récupérés dans du chloroforme. La solution chloroformique est lavée abondamment à l'eau jusqu'à neutralité, puis séchée sur du sulfate de sodium anhydre. Après filtration et passage à l'évaporateur rotatif, cette solution laisse un résidu constituant les alcaloïdes totaux. Les alcaloïdes totaux obtenus, étant sous forme d'alcaloïdes bases, insolubles dans l'eau et dans les milieux physiologiques, nous les avons ensuite transformés en sels solubles sous forme de chlorhydrates d'alcaloïdes totaux. Pour cela, après avoir dissous les alcaloïdes bases dans une quantité suffisante d'acétone, nous avons procédé à un barbotage des vapeurs d'acide chlorhydrique ($\text{NaCl} + \text{H}_2\text{SO}_4$ provoque la formation des vapeurs de HCl) dans la solution acétonique. On arrête l'opération après obtention d'un pH très acide ($\text{pH} < 3$). Après évaporation de l'acétone, on obtient un résidu de chlorhydrates d'alcaloïdes totaux. On note la masse de ce résidu.

II.7°) Tests schizontocides *in vitro*, des extraits végétaux sur les souches de *Plasmodium falciparum*, prélevées sur des individus infestés et sur la souche de *Plasmodium falciparum* W2.

II.7.1 Préparation des échantillons.

Pour l'étude sur les souches prélevées directement sur des individus infestés, les chlorhydrates d'alcaloïdes totaux et les tanins sont dissous dans de l'eau distillée à raison de 5mg/ml (Concentration initiale des solutions mères) et autoclavés à 110 °C pendant 10 minutes. On effectue des dilutions en cascade au $1/10^{\text{ème}}$ afin d'obtenir les concentrations de 5 ; 0,5 ; 0,05 ; et 0,005 mg/ml.

Pour l'étude sur la souche chloroquino-résistante W2, les extraits sont dilués à raison de 1 mg/ml (solution mère) dans l'eau pure. On effectue des dilutions successives pour obtenir 50 ; 25 ; 20 ; 15 ; 10 et 5 µg/ml.

II.7.2 Matériel biologique.

Le matériel biologique est constitué des souches de *Plasmodium falciparum* prélevées sur des enfants âgés de 2 à 7 ans du village Barogo, situé à sept (7) kilomètres de la ville de Ouagadougou après avoir, au préalable recueilli les informations concernant un éventuel traitement ou une éventuelle prophylaxie avant l'examen. Les sujets sélectionnés pour l'étude sont ceux qui ont présenté à l'examen de sang (frottis sanguin et goutte épaisse) une densité parasitaire comprise entre 500 et 10000 trophozoïtes/ μ l de sang. Pour chacun des 7 enfants ayant fait l'objet de l'étude, 10 à 15 ml de sang sont prélevés dans un tube vacutainer contenant un anticoagulant (l'EDTA) et portés le plus vite possible au laboratoire pour la mise en culture.

La souche de *Plasmodium falciparum* W2 est une souche chloroquino-résistante provenant d'Asie du sud Est et maintenue en culture au laboratoire.

II.7.3 Mode opératoire

II.7.3.1 Culture de *Plasmodium falciparum in vitro*.

Nous avons suivi les protocoles standards des cultures de *Plasmodium falciparum in vitro*. (Asahi & Kanazawa, 1994 ; Payne & Wernsdorfer, 1989).

Après avoir prélevé 10 ml de sang veineux sur des enfants porteurs asymptomatiques du parasite, on centrifuge à 2000 g pendant 7 minutes à 25 °C. Le sérum est recueilli puis décomplémenté au bain marie à 56°C pendant 30 minutes. Le culot renfermant les globules rouges parasités est resuspendu dans du RPMI-1640 jusqu'à 10% d'hématocrite, supplémenté avec 10% de sérum autologue, de la streptomycine 5 mg/ml, de la L-glutamine 200 mM, du bicarbonate de sodium 7,5% et du tampon HEPES 1M. On répartit 150 μ l de ce mélange et on

y ajoute 50 μ l d'extraits végétaux. Les concentrations finales d'extraits correspondants aux différentes dilutions sont: 1,25 ; 0,125 ; 0,0125 et 0,00125 mg/ml. On recouvre les plaques de parafilm et on incube pendant 24 et 48 heures à 37°C, sous atmosphère enrichie en CO₂ à l'aide d'une bougie. On réalise ensuite les gouttes épaisses suivies de la lecture des lames au microscope photonique à l'objectif x 100. La numération du nombre de trophozoïtes et de schizontes par μ l de sang est donnée par la formule: (Nombre de parasites x 8000) / 2000

8000 : nombre de leucocytes contenus dans 1 μ l de sang.

2000 : On estime à 20, le nombre de leucocytes contenus dans un champ optique, soit 2000 leucocytes dans 100 champs optique lus pour chaque goutte épaisse.

Le pouvoir antiplasmodique de l'extrait est évalué *in vitro*, par le pourcentage d'inhibition de la maturation des schizontes pour chaque concentration et ce, par rapport aux puits témoins. Les pourcentages d'inhibition de la maturation des schizontes sont calculés comme suit:

$$\% \text{ de maturation des schizontes} = \frac{\text{Nombre moyen de schizontes pour une concentration donnée}}{\text{Nombre moyen de schizontes des puits témoins.}}$$

$$\% \text{ d'inhibition de la maturation des schizontes} = 100\% - \% \text{ de maturation des schizontes.}$$

La quantification de l'effet inhibiteur d'un extrait est basée sur la valeur de la CI50 (concentration inhibant la croissance de 50% des parasites). L'analyse de la relation entre la dose logarithmique et le pourcentage (%) d'inhibition de la maturation des schizontes donne une courbe d'équation de type $y = ax^2 + bx + c$, à

partir de laquelle nous avons déterminé les CI50 des extraits végétaux. Le tracé du % d'inhibition = $f(-\log[\text{extrait}])$ suit une régression polynomiale d'ordre 2.

II.7.3.2 Culture continue de *Plasmodium falciparum* W2.

Nous avons utilisé les protocoles élaborés par Jensen & Trager, 1977 ; Butcher, 1979 et Trager, 1982 pour la mise en culture de *Plasmodium falciparum*.

On parle de culture continue dans le cadre du paludisme, lorsqu'une souche de *Plasmodium*, prélevée à partir du sang d'un individu parasité, cultive *in vitro* depuis plus de 5 semaines en se multipliant au moins 5 fois en 48 heures et qui est capable de se multiplier à nouveau après stockage en azote liquide.

II.7.3.2.1 Préparation du milieu de culture et entretien de la culture.

Le protocole de préparation du milieu de culture est presque identique à celui que nous avons utilisé pour l'étude sur des individus infestés, du moins en ce qui concerne les réactifs utilisés. La particularité de la culture continue est liée au fait qu'elle nécessite une déleucocytation du sang total. La déleucocytation est faite par chromatographie sur gel de cellulose ou par élimination après centrifugation de la fraction renfermant les globules blancs. Dans tous les cas, le pourcentage de parasitémie devra être de 1%. L'entretien de la culture nécessite le renouvellement quotidien du milieu de culture, ainsi que le contrôle des conditions physico-chimiques. Le pH du milieu de culture a été maintenu entre 7 et 7,6. La température d'incubation est de 37°C. Seuls les hématies d'individus de groupes A ou O sont utilisées pour l'entretien des souches. La durée du renouvellement du milieu de culture est fonction de la rapidité de multiplication de la souche.

II.7.3.2.2 Test d'inhibition.

La solution mère de chloroquine, utilisée comme contrôle est préparée à raison de 10µg/ml. On réalise des dilutions successives afin d'obtenir 0,5 ; 0,1 ; 0,05 ; 0,01 ; 0,005 et 0,002µg/ml. Les extraits de plante sont dilués à raison de 1mg/ml (solution mère) dans l'eau ultra-pure. On effectue ensuite des dilutions successives pour obtenir 50 ; 25 ; 20 ; 15 ; 10 ; et 5µg/ml. La parasitémie est de 1%. La culture du parasite est faite avec 10% de sérum humain décomplémenté à 56°C, 2mM de L-glutamine, 25mM de tampon HEPES et 25µg/ml de gentamycine. Le milieu de culture, en général liquide renferme 5% de CO₂, 5% d'O₂ et 90% d'N₂. On introduit 25µl de chaque échantillon dans le milieu de culture pour un volume final de 500µl. On distribue 200µl par puits et l'incubation a lieu pendant 24h. Dans les puits témoins, on ajoute 25µl d'eau distillée à la place des extraits. La fixation de l'iodure de propidium à l'ADN des hémoparasites a été réalisée selon le protocole décrit par Pattanapanyasat & *al.*, 1992. La quantification a été faite après lecture au cytomètre de flux (Becton Dickinson). A une longueur d'onde d'excitation de 488nm, l'iodure de propidium émet une lumière fluorescente détectable à 530nm et dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'hématies parasitées. La lecture est faite sur 10000 hématies et les valeurs obtenues sont données sous forme logarithmique. Les cultures sont toutes asynchrones.

La quantification au cytomètre de flux est beaucoup plus rapide que celle par comptage microscopique. Plusieurs travaux ont montré l'existence d'une excellente corrélation entre les deux méthodes (coloration au Giemsa et cytométrie de flux), notamment ceux de Wyatt & *al.*, 1991 ; Davis & *al.*, 1992 ; Pattanapanyasat & *al.*, 1992. Nous avons donc choisi de quantifier au cytomètre de flux. Le principe de l'exploitation des résultats est identique à celui décrit pour la goutte épaisse.

II.8°) Détermination des concentrations d'extraits végétaux à effets lytiques sur les hématies humains.

II.8.1 Intérêt de l'étude

La phase érythrocytaire du cycle de croissance de *Plasmodium falciparum*, responsable des accès palustres se déroule dans l'hématie. L'une des conditions nécessaires à l'utilisation d'une drogue présentant un pouvoir antimalarique *in vitro*, est l'absence de propriétés hémolytiques de celle-ci. Afin d'en juger, nous avons mis à profit une méthode spectrophotométrique fondée sur la capacité de l'hémoglobine extra-érythrocytaire d'absorber à 540 nm +/- 20 nm.

II.8.2 Préparation des échantillons.

Nous avons préparé une solution mère de chloroquine à 10 µg/ml. On effectue ensuite des dilutions successives au 1/10^{ème} de façon à obtenir 10; 1; 0,1; et 0,01 µg/ml. La CI50 de la chloroquine est d'environ 0,5 µg/ml. (Gentilini, 1991). Les solutions mères d'extraits de plantes sont préparées à raison 5 mg/ml dans de l'eau ultrapure (eau milliQ). On effectue des dilutions en cascade au 1/10^{ème} pour obtenir 5 ; 0,5 ; 0,05 et 0,005 mg/ml (concentrations initiales).

II.8.3 Matériel biologique

Nous avons prélevé 10 ml de sang veineux chez deux personnes volontaires, ayant vécu en zone d'endémie palustre et séjournant actuellement en zone de non transmission, donc indemne de la maladie.

II.8.4 Méthode

Le sang (10 ml) fraîchement recueilli dans des tubes imprégnés d'EDTA, est centrifugé à 2500 g pendant 10 minutes. Le plasma est mis de côté et le culot

renfermant les globules rouges est divisé en deux fractions. La première servira à l'établissement d'une courbe étalon, la deuxième au dosage de l'hémoglobine.

II.8.5 Etablissement de la courbe étalon.

Le premier culot renfermant les globules rouges est lysé en présence d'un détergent (tween 20). On obtient une libération de l'hémoglobine totale. On dilue 100 fois cette solution dans du RPMI-1640 de façon à obtenir une DO (550 nm) maximale de 1. On effectue des dilutions successives au $\frac{1}{2}$ à partir de la solution mère d'hémoglobine (150 mg/ml) pour obtenir 1,5 ; 0,75 ; 0,375 ; 0,19 ; 0,094 ; 0,047 et 0,023 mg/ml. Le tracé $DO = f(\text{taux d'hémoglobine})$ permettra de déterminer les concentrations hémolytiques des extraits végétaux.

II.8.6 Dosage spectrophotométrique de l'hémoglobine.

La fraction de globules rouges, servant au dosage est diluée 100 fois dans du RPMI-1640 et supplémentée avec 1ml de sérum autologue. On prélève des aliquotes de 150 μl de la suspension et on y ajoute 50 μl d'extraits de plante ou 50 μl d'eau dans les puits témoins. Le volume final par puits est de 200 μl . Les concentrations finales des extraits sont ainsi de: 1,25 ; 0,125 ; 0,0125 et 0,00125 mg/ml. On recouvre les plaques de parafilm et on incube pendant 24 heures à 37°C. Le lendemain, on centrifuge les plaques à 2500 g pendant 10 minutes. On recueille 100 μl de surnageant que l'on introduit dans des plaques ELISA. Les absorbances sont lues au spectrophotomètre de plaque à 550 nm. A l'aide de la courbe $DO = f(\text{taux d'hémoglobine})$, nous avons déterminé le taux d'hémoglobine libéré par les extraits.

II.9°) Chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits d'alcaloïdes totaux.

Afin de connaître le nombre de composés ou groupes de composés constituant la fraction d'alcaloïdes totaux extraits des feuilles et des racines de *Mitragyna inermis*, nous avons procédé à des chromatographies sur couche mince (gel de silice, Polygram Sil G, 0,25mm) avec plusieurs solvants et mélange de solvants de polarité différente. La révélation a été faite par illumination aux rayons ultra violet à 254nm, par pulvérisation des vapeurs d'iode et enfin avec un réactif spécifique des alcaloïdes (le réactif de Dragendorff).

B°) CONTROLE GENETIQUE DE LA CHARGE PARASITAIRE SANGUINE.

L'objectif de cette étude est d'identifier des gènes contrôlant le niveau d'infection et la maladie palustre, dans le but de mettre en évidence des voies d'approches nouvelles pour le développement de stratégies préventives et thérapeutiques du paludisme. Ce travail de génétique humaine prend appui sur une importante étude épidémiologique réalisée par notre équipe au Burkina Faso de 1993 à 1996 (Traore & *al.*, 1999).

B.1°) Données épidémiologiques.

II.10°) Caractéristiques de la zone d'étude.

L'étude a été effectuée sur une population de 509 individus répartis en 53 familles du village Laforisso, situé à 15 kilomètres de la ville de Bobo Dioulasso au sud ouest du Burkina Faso, où le paludisme est endémique. Les données recueillies, puis analysées par notre équipe, montrent que 60% de la population a moins de quinze ans, le sex ratio est de 0,76 et les données entomologiques montrent que les niveaux d'expositions sont de l'ordre de 230 piqûres infestantes par personne et par an, et qu'il ne semble pas exister des différences d'exposition entre les individus. (Traoré & *al.*, 1999). Tous les adultes inclus dans l'étude ont été complètement informés des objectifs du travail et ont donné leur accord. Ils ont pu bénéficier d'examens biologiques réguliers et d'un accès gratuit à certains soins. Le protocole de l'étude a été approuvé par le Ministère de la santé du Burkina Faso et par les autorités sanitaires de la ville de Bobo Dioulasso (Direction Provinciale de la Santé). Dans cette population, la charge parasitaire sanguine, les accès palustres et de nombreuses données immunologiques ont été déterminés.

II.11°) Détermination de la charge parasitaire sanguine.

Afin de déterminer le choix de la fréquence des prélèvements, une étude journalière réalisée par notre équipe sur soixante enfants du village de moins de 10 ans pendant trois semaines, a montré que deux prélèvements mensuels reflètent la parasitémie journalière moyenne de l'individu ($r = 0,8$). Les valeurs de la densité parasitaire obtenues sur gouttes épaisses et sur frottis montrent une excellente corrélation ($r = 0,9$). La parasitémie a été déterminée tous les mois en période de faible transmission et tous les 15 jours en période de forte transmission du paludisme (Juin à Octobre). Toutes les densités parasitaires ont été déterminées par au moins deux lecteurs. Durant deux années de l'étude, vingt (20) passages ont été réalisés. Le nombre moyen de prélèvements effectués par individus est de 12,8 (extrêmes de 1 à 20). Les frottis sanguins sont fixés au méthanol puis colorés au Giemsa pendant 30 minutes. Après rinçage et séchage des lames, le pourcentage de parasitémie est calculé en faisant le rapport du nombre de globules rouges parasités sur le nombre de globules rouges totaux. La densité parasitaire (DP) est établie en comptant le nombre de parasites dans 100 champs optiques au grossissement $\times 100$, sur la base de 200 hématies par champ et une moyenne de 4 millions d'hématies par mm^3 de sang. A partir de la valeur de la DP, une transformation logarithmique $\text{Ln}(1 + \text{DP})$ ou (LDP) est alors effectuée. Pour chaque passage, la valeur de la charge parasitaire sanguine moyenne (LDP) a été établie à partir de la totalité de la population présente lors de ce passage. Afin de prendre en compte les variations saisonnières, chaque LDP individuelle a été corrigée en lui soustrayant la moyenne des LDP calculée lors de chaque passage. Une nouvelle variable, la moyenne des densités parasitaires ajustée (MDPA) a été

ainsi définie pour chaque individu. Cette valeur moyenne des densités parasitaires servira d'index individuel pour les analyses statistiques.

II.12°) Facteurs pouvant influencer sur la parasitémie

Afin d'évaluer les niveaux d'expositions aux vecteurs du paludisme (*Anopheles gambiae*, *Anopheles nili* et *Anopheles funestus*), des captures nocturnes sont effectuées sur appât humain de 18 heures à 6 heures tous les 15 jours dans quatre sites de prélèvements répartis dans le village. Les anophèles sont identifiés morphologiquement. Afin d'évaluer leur degré d'infectivité, la tête et le thorax sont broyés et analysés par ELISA pour détecter la présence d'antigènes circumsporozoïtaires (CSP) de *Plasmodium falciparum* dans les glandes salivaires du moustique. Les taux d'inoculation sont alors déterminés. (Nombre de piqûres infestantes par personne pendant une période donnée). D'autres facteurs pouvant influencer sur la MDPA ont été recherchés. Les différentes hémoglobines AA, AS, AC, SC, CC, et les groupes sanguins ABO et Rhésus ont été déterminés. La détermination des hémoglobines, a été réalisée par électrophorèse sur gel d'acétate de cellulose et les groupes sanguins ont été déterminés par agglutination en utilisant deux séries d'anticorps commercialisés (Burkot & al., 1984). L'effet de l'âge, du sexe, des hémoglobinopathies et du niveau d'exposition sur la MDPA a été évalué par analyse multivariée. Ce type d'analyse permet d'évaluer simultanément l'influence des différents facteurs en prenant en compte leur interdépendance éventuelle.

B.2°) Approches génétiques.

II.13°) Prélèvement sanguin et isolement des PBMC (Peripheral Blood Monocyte Cell).

Nous avons eu recours au protocole élaboré par Bøyum en 1968 pour isoler les PBMC. On prélève 10 ml de sang sur tube hépariné. Cet échantillon de sang est dilué au ½ dans du RPMI. Après homogénéisation, on dépose délicatement ce mélange sur du milieu Ficoll dans des tubes de 15ml. On centrifuge à 1700 g pendant 10 min sans frein à 18°C. On prélève ensuite délicatement l'anneau blanchâtre renfermant les PBMC se trouvant à la surface du Ficoll. Les cellules sont lavées dans du RPMI pour éliminer le Ficoll, puis elles sont mises dans des cryotubes et conservées à -80 °C, en attendant l'extraction des ADN.

II.14°) Extraction de l'ADN.

Nous avons utilisé la méthode d'extraction de l'ADN à haute force ionique développée par Miller & *al.*, 1988. Cette technique bien qu'étant assez longue, est cependant moins coûteuse et non toxique que la méthode classique utilisant le phénol.

II.14.1 Lyse des globules rouges

Les différentes étapes s'effectuent à 4°C. La totalité du culot renfermant les PBMC, est mélangé avec du tampon de lyse des globules rouges (Blood Lysis Buffer ou BLB, composition cf annexe 2.c) dans un volume final de 10 ml. On centrifuge à 3000 g pendant 10 min. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 10ml de BLB. Cette opération est renouvelée 3 fois jusqu'à obtention d'un culot blanc.

II.14.2.Lyse des PBMC.

Le culot cellulaire renfermant les PBMC est repris dans 3ml de tampon de lyse des globules blancs (White Lysis Buffer ou WLB, composition cf annexe 2.d) et resuspendu au vortex jusqu'à dissociation complète du culot. Après un ajout de 150 μ l de SDS 20% et de 100 μ l de protéinase K à 20 mg/ml, on laisse incubé une nuit à 37°C. Le lendemain, les protéines sont précipitées avec 1ml de NaCl 6M. Une centrifugation à 3600 g pendant 20 min à température ambiante permet de récupérer le surnageant contenant l'ADN. Ce dernier est précipité avec 10ml d'éthanol absolu froid (-20°C), sous agitation manuelle. Après passage dans 5ml d'éthanol à 70%, le précipité d'ADN de couleur blanche et super enroulé, que le langage du laboratoire assimile à une méduse (figure 14), est dissout dans du tampon TE (Tris-EDTA de composition, cf annexe 2.e). La dissolution de l'ADN est accélérée par une incubation de 30 min à 65°C puis avec un agitateur rotatif à la température ambiante. Au total, nous avons extrait 339 ADN d'individus pour l'étude.

II.15°) Contrôle de la pureté de l'ADN.

Les acides nucléiques absorbent à 260nm. Les protéines absorbent aussi bien à 260nm qu'à 280nm. L'ADN étant associé à des protéines, il est nécessaire d'évaluer sa pureté. La mesure spectrophotométrique du rapport DO 260 / DO 280 a été utilisée pour apprécier le degré de contamination par les protéines et ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2 ; le plus proche possible de 2 pour un ADN quasi pur. Les échantillons d'ADN ayant un rapport de DO compris entre 1,8 et 2 sont conservés à +4°C, ceux ne présentant pas un rapport compris dans cette intervalle sont traités à nouveau.

II.16°) Dosage spectrophotométrique de l'ADN.

Le principe de ce dosage, repose sur l'application de la loi de Beer et Lambert, selon laquelle lorsqu'un faisceau monochromatique traverse un échantillon,

l'intensité de la lumière émise est proportionnelle à la concentration de l'échantillon.

La relation $[ADN] = (DO\ 260) \times d \times 50\mu g/ml$, permet de déterminer la concentration d'ADN d'un échantillon en $\mu g/ml$:

(DO 260): absorbance de la solution d'ADN à 260 nm.

d : facteur de dilution, qui est de 50.

50 $\mu g/ml$: facteur de conversion (On estime qu'une unité de DO_{260} d'une solution d'ADN double brin correspond à 50 $\mu g/ml$).

II.17°) Dosage fluorimétrique de l'ADN.

Il s'agit d'une méthode de dosage des ADN beaucoup plus sensible que la méthode spectrophotométrique. Le principe repose sur l'utilisation d'un composé intercalent de l'ADN (le picogreen) qui, une fois fixé entre les nucléotides et suite à une source lumineuse excitatrice à 480nm, émet une lumière fluorescente de couleur verte, détectable à 530nm. L'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADN contenue dans l'échantillon. La courbe étalon est réalisée à partir de l'ADN pur du phage lambda (2 $\mu g/ml$) dilué aux concentrations 800 ; 400 ; 200 ; 100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 et 3,12 ng/ml. Les dilutions sont faites dans du tampon TE 1X (composition, cf annexe 2.e). Les échantillons d'ADN sont dilués au 1/500^{ème} dans du TE et au 1/2^{ème} après l'ajout du picogreen, soit une dilution finale au 1/1000^{ème}. Les concentrations en ADN des échantillons ont été déterminées à partir de la gamme de dilution de l'ADN du phage λ , et en tenant compte du facteur de dilution qui est de 10^3 , on obtient des résultats en $\mu g/ml$. Les échantillons ayant des concentrations supérieures à 400 ng/ml sont redosés en utilisant une dilution beaucoup plus forte.

II.18°) Contrôle de la qualité de l'ADN

L'ADN est une macromolécule généralement très stable dans la cellule. Au cours des étapes d'extraction, ce dernier devient très vulnérable aux chocs mécaniques et aux digestions enzymatiques par les nucléases endogènes et exogènes engendrant des formes dégradées de la macromolécule et par voie de conséquence, affectant sa qualité et son intégrité. La qualité de l'ADN génomique est contrôlée sur gel d'agarose à 1,5% dans du TBE 0,5X (composition, cf annexe 2.f). On charge 8µl d'échantillons d'ADN plus 2µl de marqueur de migration (Bleu de Bromophénol plus Xylène cyanol ou BB+XC, composition cf annexe 2.j). Une fois la migration terminée, on révèle avec un agent intercalent de l'ADN, le bromure d'éthidium à 0,5µg/ml dans du TBE 0,5X. La lumière obtenue à partir d'un illuminateur de rayonnement ultra-violet équipé d'un appareil photo, permet d'apprécier l'état des ADN et de faire des photographies. L'absence de traînée sur le gel indique que l'ADN n'a pas été dégradé lors de l'extraction.

II.19°) Amplification des régions microsatellites par PCR.

Avant toute amplification des fragments d'ADN par PCR, on effectue des mises au point afin de déterminer les conditions optimales d'amplification pour éviter d'obtenir des amplifications parasites. C'est ainsi que la température d'hybridation retenue, est celle obtenue après avoir effectué des amplifications à plus ou moins 2°C de la température d'hybridation indiquée par le fournisseur. D'autres tests ont également été réalisés avant toute amplification, notamment en variant la quantité de dNTP et de primers. Les caractéristiques des amorces oligonucléotides et les différentes températures d'hybridations retenues sont contenues dans le tableau 1.

Noms	Séquences: (5'→3') des oligonucléotides	Taille de l'oligo.	Taille, fragment amplifié (Pb)	Taille ADN de référence	T°C Retenue
D5S393 A	5'-TTCTACCTGN CCTTTCCTCT-3'	20	162/182	172/174	57
D5S393 B	5'-CATTCCCTCATT CCTCATTCC-3'	20			
D5S399 A	5'-GAGTGTATCAGT CAGGGTGC-3'	20	116/132	118/126	60
D5S399 B	5'-GGCCTCAACTT CATAATCAA-3'	20			
D5S436 A	5'-TATGTGCCAGG CATTACGCT-3'	20	234/254	238/244	62
D5S436 B	5'-GTCTCCACCC ACAGCAGG-3'	18			
D5S487 A	5'-TCTTGTAAGC CCACAATGA-3'	20	253/267	253/259	60
D5S487 B	5'-CTGGCCTTGA AATTAGACC-3'	20			
D5S636A	5'-AAGGCATATG GGAAATATCTGT-3'	22	130/152	130/146	55
D5S636B	5'-CCACACCATTATG ACATTTTCT-3'	22			
D5S642 A	5'-AGCTCTTTACC TGGACTTACAA-3'	25	183/201	185/185	57
D5S642 B	5'-CTAGACCATAA TAACCCTGTGAT-3'	24			
D5S658A	5'-TTTGAAGGGCAC TACGAAGATCCTC-3'	25	264/282	270/278	57
D5S658B	5'-ATTCTCTATTGGA GCCAAGCCAAG-3'	24			
D5S2012A	5'-TGTAGGAGAGT GCCTGGTTC-3'	20	192/216	210/216	55
D5S2012B	5'-TGTAATTGCCA TGCAGGAA-3'	19			
D5S2090A	5'-CATGGGCATG TTTCAAAT-3'	19	189/205	189/189	57
D5S2090B	5'-AGTACCTCCTTA GTA ACTCTGGGC-3'	24			
D5S2117A	5'-CCAGGTGAGAAC CTAGTCAGAAAG-3'	24	209/237	209/217	57
D5S2117B	5'-AATCAGAAGGT GTGTGCGG-3'	19			

Tableau 1: Caractéristiques des amorces et des températures d'hybridation (Genset).

Une nomenclature particulière permet de désigner un marqueur microsatellite. Par exemple pour le marqueur D5S393A et D5S393B, la lettre D désigne l'ADN, le chiffre 5 indique le chromosome 5, 393 est un chiffre attribué suivant l'ordre chronologique de leur mise en évidence sur un chromosome donné.

La lettre A indique l'orientation dans le sens 5' → 3' de l'ADN et la lettre B, l'orientation en sens inverse 3' → 5' de l'ADN. L'ADN de référence, souvent appelé "mère 134702" est un ADN de séquences connues isolé du phage λ . Cet ADN permet de déterminer la taille d'amplification des différents marqueurs microsatellites. Par exemple pour le marqueur D5S393, la taille d'amplification est de 172/174 pb. L'analyse des dix (10) marqueurs microsatellites a été effectuée selon la méthode décrite par Vignal & *al.*, 1993.

II.19.1 Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).

Sur 339 échantillons d'ADN des individus de l'étude, 31 échantillons appartenant à des familles non informatives (soit à cause du nombre limité de paires de germains et/ou, suite à l'absence du génotype des deux parents), ont été éliminés. Les 308 échantillons d'ADN restants et l'ADN de référence utilisé comme contrôle, ont été amplifiés avec les 10 marqueurs génétiques flanquant les microsatellites. La composition du tampon PCR est rapportée dans le tableau 2.

REACTIFS	COMPOSITION.	CONCENTRAT. INITIALE	CONCENTRAT. DANS LA PCR.	VOL. μ l /puits
Tampon 10 X GENETHON	(Composition, cf annexe 2.k)	10 X	1X	4
d(NTP)	dATP (312 μ M) dTTP (312 μ M) dCTP (312 μ M) dGTP (312 μ M)	1,25 mM	0,125 mM	5
Primers A		20 μ M	1 μ M	2,5
Primers B		20 μ M	1 μ M	2,5
H ₂ O				16
Volume total				30

Tableau 2 : Composition du tampon PCR (Généthon).

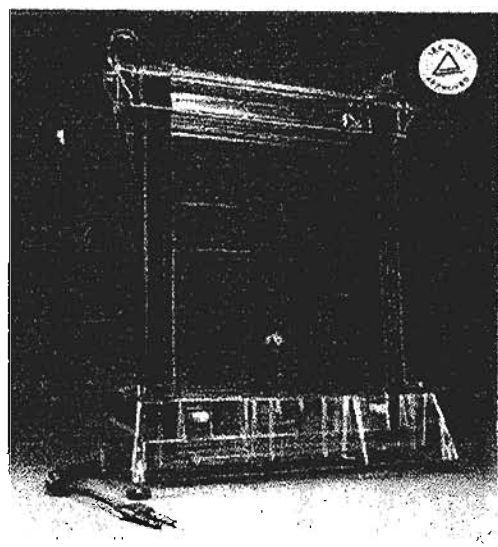
Au 30 μ l du tampon PCR, on ajoute 10 μ l du tampon refermant la Taq polymérase et 10 μ l d'ADN à 4 μ g/ml dilué dans du TE 1X, soit un volume final de 50 μ l.

Les cycles d'amplifications sont identiques pour tous les couples d'amorces : dénaturation à 96°C/5min, ajout de la Taq polymérase, vient ensuite une nouvelle dénaturation à 94°C/40sec, suivi de l'hybridation des amorces qui dure 30sec et de l'élongation à 72°C/10sec. Les étapes de dénaturation d'hybridation et d'élongation se déroulent durant 35 cycles. Les produits de la réaction sont contrôlés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans du TBE 0,5X. On charge 6 μ l de produit PCR. La migration a lieu en présence du marqueur de taille. (composition, cf. annexe 2.h.). Les gels sont colorés au bromure d'éthydiu à 0,5 μ g/ml et visualisés aux rayons ultra-violet.

II.20°) SEPARATION DES FRAGMENTS AMPLIFIES SUR GEL DE SEQUENCE.

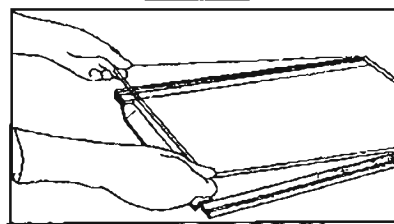
II.20.1 Préparation du support pour gel de séquence.

Après avoir nettoyé à l'eau puis à l'alcool la plaque supérieure du support pour gel de séquence, on verse la solution de silicone sur la face inférieure de cette plaque, afin d'empêcher le gel d'adhérer à celle-ci lors du démoulage des plaques. On positionne les spacers sur la plaque inférieure et on pose la plaque siliconée de manière à ce que celle-ci chevauche parfaitement avec l'autre plaque. Après fixation des supports, on rend étanche le bas du système. La figure 7, illustre les différentes étapes de préparation du support pour gel de séquence.

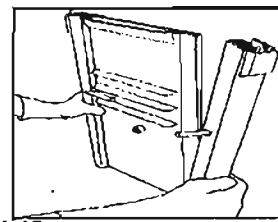


Support Gel de séquence.

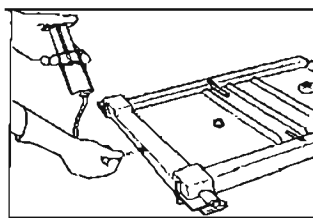
Préparation du support pour gel de séquence.



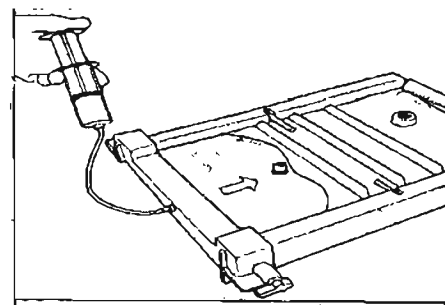
Etape 1



Etape 2



Etape 3



Etape 4

Figure 7 : Différentes étapes de préparation du gel de séquence.

II.20.2 Préparation du gel.

Le gel est préparé avec une solution d'acrylamide/bis-acrylamide 6% (composition, cf. 3.1), supplémentée avec 10% d'Ammonium persulfate (APS) et du N,N,N',N'-Tétraméthyléthylènediamine (TEMED), utilisés respectivement comme initiateur et catalyseur de la réaction de polymérisation. On positionne le peigne à dents de requin en sens inverse (dents vers l'extérieur). La polymérisation dure au minimum une heure. Une fois le gel polymérisé, on retire le peigne à dents de requin et on effectue une première migration (pré-run) dans du TBE 1X pendant 1h, en appliquant une intensité de 50mA et une tension de 3000 V. A quelques minutes de la fin du pré-run, 5 μ l de produits PCR sont mélangés avec 12 μ l de bleu de formamide désionisé (composition, cf. annexe 3.m), pour chaque puit des plaques. Après dénaturation à 96°C pendant 2 min, les plaques sont rapidement mises sur de la glace afin d'éviter d'éventuelles rénaurations. Une fois le pré-run terminé, on nettoie la partie réservée au dépôt des échantillons. On positionne le peigne à dents de requin et à l'aide d'embouts spéciaux, on charge par puit 5 μ l de produits PCR plus 12 μ l de bleu de formamide. Le bleu de formamide renferme du xylène cyanol qui migre avec des fragments de 110pb et du bleu de bromophénol qui migre avec des fragments de 240pb. La migration s'effectue en appliquant une intensité de 50mA et une tension de 3000V. La durée de la migration est fonction de la taille des fragments à séparer. Le bleu de formamide a pour effet de diminuer la température de fusion des fragments d'ADN et sert en même temps de marqueurs de migration. Les fragments d'ADN séparés en gel de polyacrylamide sont retenus dans la matrice du gel et donc difficilement détectable par la sonde utilisée. En pareil cas, la sonde polyAC et les séquences nucléotidiques sont trop volumineux pour diffuser à travers le gel et se combiner spécifiquement. C'est pourquoi, nous

avons procédé à un transfert des fragments d'ADN sur une membrane de nylon. Cette membrane de nylon est chargée de groupements ammonium quaternaire et contracte des liaisons ioniques avec les groupements anioniques des fragments d'ADN. La membrane de nylon a aussi l'avantage d'être résistante au choc mécanique et plusieurs hybridations / déshybridations peuvent être effectuées avec une même membrane.

II.21°) Transfert des fragments d'ADN sur membrane de nylon.

Une fois la migration terminée, on refroidit l'extérieur des plaques à l'eau du robinet. Après avoir retiré les deux supports, on retourne le système, indicateur de température vers le haut. On soulève progressivement la plaque siliconée en évitant toute déchirure du gel. Deux papiers Whatman imbibés de TBE 1X (Tris-Borate-EDTA 1X) sont déposés sur une paillasse propre et parfaitement plane. On prend une feuille de papier Whatman sèche que l'on pose sur le gel. Le papier Whatman adhère au gel lorsque l'on fait rouler une pipette dessus. A l'aide d'un scalpel, on découpe le gel tout autour du papier Whatman. On soulève l'ensemble, que l'on dépose sur les deux papiers Whatman préalablement imbibés de TBE 1X. Une membrane de nylon, renfermant des groupements ammonium quaternaire est découpée aux dimensions du papier Whatman, imbibée de TBE 1X, puis placée bord à bord sur le gel. On la fait adhérer à l'aide d'une pipette. Cette étape permet également d'évacuer les bulles d'air. Trois feuilles sèches de papiers whatman et une plaque de verre sont placées sur la membrane. Le transfert des fragments d'ADN amplifiés a lieu par capillarité toute la nuit à la température ambiante. Le lendemain, on retire la plaque de verre et les trois feuilles de papier whatman. La membrane de nylon est mise dans du tampon SSC 2X (Sel Sodium Citrate 2X de composition, cf. annexe 2.g), et le gel se décolle de la membrane. Cette dernière est alors

égouttée puis irradiée aux ultra-violetts (254nm), pour la fixation covalente de l'ADN à la membrane de nylon. L'irradiation a lieu avec une énergie de 0,12J pendant 45 secondes. La membrane est conservée à 4°C dans un sac plastique renfermant du tampon SSC 2X jusqu'à l'hybridation.

II.22°) HYBRIDATION ADN / SONDE POLYAC.

L'hybridation de la sonde polyAC avec les séquences microsatellites amplifiées repose sur le principe de la complémentarité des bases entre molécules d'acides nucléiques.

II.22.1 Préhybridation et hybridation des membranes de nylon.

Les membranes de nylon sont retirées des sacs plastiques et roulées à l'aide d'une pipette. Chacune des membranes est introduite dans un tube Appligène. On fait couler le long de la membrane sans la toucher, 20ml de tampon d'hybridation (Composition, cf. annexe 3.n) préalablement chauffé à 38°C. Chacune des membranes est déroulée lentement dans le sens de rotation du four d'hybridation en évitant de faire des bulles. Les tubes Appligènes sont placés dans le four d'hybridation à 38°C, pour une rotation de 7,5 tours/min. La pré-hybridation dure une heure. Pendant le dernier quart d'heure de la pré-hybridation, on prépare la sonde polyAC en mélangeant pour une membrane 6,4µl de sonde polyAC 300ng (Composition, cf. annexe 3.o) que l'on complète à 120µl avec de l'eau pure. On ajoute 120µl de peroxydase et 120µl d'agent couplant (glutaraldéhyde) provenant du kit ECL. Le glutaraldéhyde fixe de façon covalente la peroxydase à la sonde polyAC. L'ensemble est agité au vortex et incubé au bain marie à 37°C pendant 10 min. Une fois la pré-hybridation terminée, on ajoute 350µl de sonde polyAC couplé à la peroxydase. L'hybridation a lieu toute la nuit à 38°C avec une rotation de 7,5 tours/min.

II.22.2 LAVAGE DES MEMBRANES HYBRIDEES

Une fois l'hybridation terminée, On élimine le tampon d'hybridation et l'on sort les membranes contenues dans les tubes appligènes. Ces membranes sont lavées une fois 15 minutes dans du tampon SSC 3X-SDS 0,1% à 42°C, deux fois 20 minutes dans du SSC 0,2X à 42°C et une fois 5 minutes dans du SSC 2X à température ambiante. Tous les lavages ont lieu sous agitation.

II.23°) REVELATION

La révélation de la réaction entre la sonde polyAC et les séquences microsattelites repose sur une réaction chimioluminescente (Figure 8).

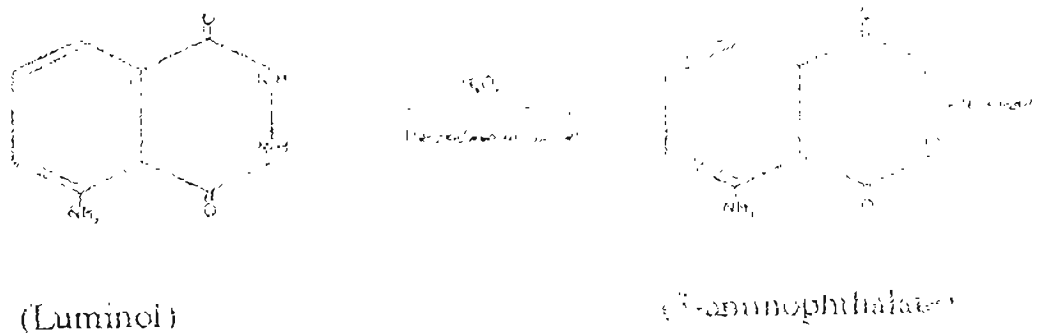


Figure 8 : Réaction chimioluminescente.

La réduction de l'eau oxygénée (H_2O_2) par la peroxydase, couplée à l'oxydation du luminol provoque la formation du 3-aminophthalate avec libération d'une lumière bleue détectable par un film hypersensible. Le profil de l'autoradiographie obtenu est une copie conforme du gel.

Le substrat de la peroxydase est préparé en mélangeant à volume égal 125ml de luminol et 125ml de solution d'eau oxygénée pour quatre membranes. Après avoir bien essoré les membranes, on introduit chacune des membranes dans la cuvette renfermant le substrat pendant une minute. On essore à nouveau les

membranes sur les rebords de la cuvette puis sur du papier filtre. Chacune des membranes est ensuite placée dans une cassette entre deux feuilles plastiques. A l'aide d'un kleenex on nettoie le plastique. Dans une chambre noire, on pose un film hypersensible dans la cassette, au dessus de la membrane de nylon, on ferme la cassette et on laisse exposer pendant 10 minutes. On ouvre la cassette et on introduit le film dans la machine à développer. Selon la qualité de l'autoradiographie, on expose plus ou moins longtemps. Il est formellement conseillé de poser le film en une seule fois en évitant de le bouger, car l'autoradiographie risque d'être trouble. Pour chaque membrane, plusieurs films d'expositions différentes sont réalisés.

II.24°) **Génotypage et contrôle des génotypes.**

Après avoir identifié les pistes de migration correspondant à l'ADN de référence ou ADN contrôle, on affecte le chiffre 0 à l'allèle inférieur de cet ADN contrôle et un chiffre positif correspondant selon le marqueur à la différence de taille des deux allèles de l'ADN contrôle. Par exemple, pour le marqueur D5S399, la taille de l'ADN de référence est 118/126, soit 0/8 utilisé pour la lecture de l'autoradiographie. Une fiche de lecture permet de mentionner les génotypes des individus. Les lectures des films sont faites par au moins deux lecteurs. Après confrontation des génotypes obtenus, on contrôle la distribution familiale du trait, c'est-à-dire que l'on vérifie si les germains ont hérité des allèles de leurs parents. Un système de codage est enfin utilisé pour entrer les génotypes retenus pour les analyses statistiques. Nous reviendrons sur ce point, dans la partie réservée aux résultats des génotypes obtenus.

II.25°) Les méthodes statistiques utilisées pour l'analyse de ségrégation et de liaison génétique.

Les développements récents des techniques de cartographie génétique et physique permettent l'identification des gènes impliqués dans les maladies dites multifactorielles telle que le paludisme. Des méthodologies statistiques permettent de mettre en évidence les facteurs de susceptibilité/résistance génétique, d'élucider leurs mécanismes d'action et leurs interactions avec les facteurs de milieu dans l'étiologie de ces pathologies. Ces méthodes incluent des approches paramétriques et des approches non paramétriques comme la méthode des paires de germains.

II.25.1 Analyse de ségrégation.

L'analyse de ségrégation est la première étape permettant de déterminer, à partir de données familiales, le mode de transmission d'un gène contrôlant le phénotype. Le principe général de cette méthode est de déterminer par des tests statistiques, le mode de transmission expliquant le mieux les distributions familiales observées du phénotype étudié. Divers modèles ont été développés, permettant d'inclure l'influence des facteurs environnementaux et génétiques dans les différentes hypothèses concernant le mode de transmission du phénotype. Les différentes hypothèses pouvant expliquer les distributions familiales observées sont testées les unes par rapport aux autres (Bonney, 1984 et 1988). Plus précisément, l'analyse consiste à : ajuster les données sur les facteurs de milieu influençant significativement le phénotype étudié. A partir des données ajustées, on répond alors aux questions suivantes : existe-t-il une ressemblance familiale ? Si oui, cette ressemblance est-elle, au moins en partie, expliquée par la présence d'un gène majeur ? Si oui, les distributions familiales

observées sont-elles compatibles avec les lois de transmission mendéliennes ? Différents tests permettent alors de vérifier la compatibilité des distributions observées avec celles attendues d'après les lois de Mendel. Ce n'est qu'à ce moment que l'on peut conclure à l'existence ou non d'un gène majeur intervenant dans l'expression du phénotype étudié.

II.25.2 Analyse de liaison génétique

L'analyse de liaison génétique étudie la coségrégation familiale du trait et du marqueur génétique, afin de déterminer s'il y a ou non indépendance de ségrégation du trait pathologique et du marqueur étudié. Si les deux locus sont situés sur le même chromosome, ils sont physiquement liés et l'on peut observer une ségrégation non indépendante des allèles à ce locus. Des modèles mathématiques permettent de connaître les différents paramètres génétiques (Bonney, 1984). L'analyse de liaison génétique par la méthode des lod scores, permet de tester l'hypothèse nulle H_0 de ségrégation indépendante des deux locus (taux de recombinaison entre les deux locus, θ_0 , égal à 0,5) par rapport à l'hypothèse alternative de liaison génétique ($0 < \theta_1 < 0,5$). Le lod score est le rapport du logarithme décimale de vraisemblance de ces deux hypothèses. Différents programmes informatiques permettent de calculer le lod score notamment le programme Linkage (Demenais & Bonney, 1989). La recherche de liaison génétique par les méthodes des paires de germains (sibs pairs), ne nécessite pas de connaître la modélisation du système. Le principe de cette méthode repose sur l'hypothèse selon laquelle, si un locus marqueur est lié au gène de morbidité, les paires de germains atteints auront un génotype identique au locus marqueur plus souvent que ne le voudrait le hasard. Il est possible de savoir si une paire de germains atteints ont reçu de leur parent 0; 1 ou 2 allèles identiques au niveau du locus marqueur. Les paires de germains sont classées

suivant la valeur absolue de la différence phénotypique (différence de parasitémie), avec le rang i pour la $i^{\text{ème}}$ paire de germains. Pour chaque marqueur M , on définit la statistique :

$$X(M) = \sum_{i=1}^n \text{rang } i \times f(\gamma_i)$$

γ_i , est le nombre d'allèles partagés par la $i^{\text{ème}}$ paire de germains. En général $f(2) = -1$, $f(1) = 0$, $f(0) = 1$. En l'absence de liaison, la valeur attendue de $X(M)$ est 0, la variance :

$$V = \frac{n(n+1)(2n+1)}{12} \text{ et le ratio } Z(M) = \frac{X(M)}{\sqrt{V}}$$

suit une loi normale centré réduite. On teste cette liaison par un test unilatéral ($Z(M) > 0$). Pour tester l'existence d'une liaison génétique, il suffit de comparer la distribution observée des IBD dans un échantillon de paires de germains atteints avec la distribution attendue s'il n'y a pas liaison.

Pour détecter la liaison avec un trait quantitatif, le nombre d'allèles partagés par les germains au locus marqueur est comparé avec la différence phénotypique entre les germains.

Si le locus marqueur est proche du locus morbide recherché, la différence phénotypique entre les germains ne partageant pas d'allèles au locus marqueur sera plus grande que la différence phénotypique entre les germains partageant deux allèles au locus marqueur. La méthode d'Haseman & Elston (1972), a été décrite la première et implique l'hypothèse de normalité du phénotype. La méthode non paramétrique de Kruglyak & Lander (1995), n'implique pas d'hypothèse sur la distribution du phénotype. C'est cette méthode beaucoup plus " robuste " que nous avons utilisée. Le programme informatique mis à profit pour l'analyse statistique des paires de germains est le MAPMAKERS/SIBS.

CHAPITRE III :

RESULTATS ET DISCUSSION

suivant la valeur absolue de la différence phénotypique (différence de parasitémie), avec le rang i pour la $i^{\text{ème}}$ paire de germains. Pour chaque marqueur M , on définit la statistique :

$$X(M) = \sum_{i=1}^n \text{rang } i \times f(\gamma_i)$$

γ_i , est le nombre d'allèles partagés par la $i^{\text{ème}}$ paire de germains. En général $f(2) = -1$, $f(1) = 0$, $f(0) = 1$. En l'absence de liaison, la valeur attendue de $X(M)$ est 0, la variance :

$$V = \frac{n(n+1)(2n+1)}{12} \text{ et le ratio } Z(M) = \frac{X(M)}{\sqrt{V}}$$

suit une loi normale centré réduite. On teste cette liaison par un test unilatéral ($Z(M) > 0$). Pour tester l'existence d'une liaison génétique, il suffit de comparer la distribution observée des IBD dans un échantillon de paires de germains atteints avec la distribution attendue s'il n'y a pas liaison.

Pour détecter la liaison avec un trait quantitatif, le nombre d'allèles partagés par les germains au locus marqueur est comparé avec la différence phénotypique entre les germains.

Si le locus marqueur est proche du locus morbide recherché, la différence phénotypique entre les germains ne partageant pas d'allèles au locus marqueur sera plus grande que la différence phénotypique entre les germains partageant deux allèles au locus marqueur. La méthode d'Haseman & Elston (1972), a été décrite la première et implique l'hypothèse de normalité du phénotype. La méthode non paramétrique de Kruglyak & Lander (1995), n'implique pas d'hypothèse sur la distribution du phénotype. C'est cette méthode beaucoup plus " robuste " que nous avons utilisée. Le programme informatique mis à profit pour l'analyse statistique des paires de germains est le MAPMAKERS/SIBS.

CHAPITRE III :

RESULTATS ET DISCUSSION

A°) ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES EXTRAITS VEGETAUX

III.1°) Mise en évidence et dosage des tanins et des alcaloïdes contenus dans les plantes étudiées.

Les résultats obtenus à la suite des tests de caractérisation des tanins au chlorure ferrique et des alcaloïdes par les réactifs de Mayer et de Dragendorff (Tableau 3), montre que les espèces *A. leiocarpus*, *C. sieberiana* et *P. biglobosa* sont riches en tanins et pauvres en alcaloïdes, aussi bien au niveau des feuilles que des racines.

Par contre, *M. inermis* et *N. latifolia*, espèces riches en d'alcaloïdes contiennent peu de tanins.

Plantes médicinales étudiées.	Feuilles		Racines	
	alcaloïdes	tanins	alcaloïdes	tanins
<i>A. leiocarpus</i>	++	+++	+	+++
<i>B. rufescens</i>	+	+	++	++
<i>C. sieberiana</i>	+	+++	++	++
<i>M. inermis</i>	+++	++	+++	+
<i>N. latifolia</i>	nd	nd	+++	+
<i>P. biglobosa</i>	+	+++	+	+++
<i>T. roka</i>	++	++	++	++

Tableau 3 : Mise en évidence des tanins et des alcaloïdes totaux.

+++ : renferme beaucoup d'alcaloïdes ou de tanins.

++ : renferme assez d'alcaloïdes ou de tanins.

+ : renferme très peu d'alcaloïdes ou de tanins.

nd : non déterminé.

Une étude quantitative (dosage gravimétrique) a été mise à profit (Figure 9) pour déterminer la teneur en tanins et en alcaloïdes des plantes étudiées.

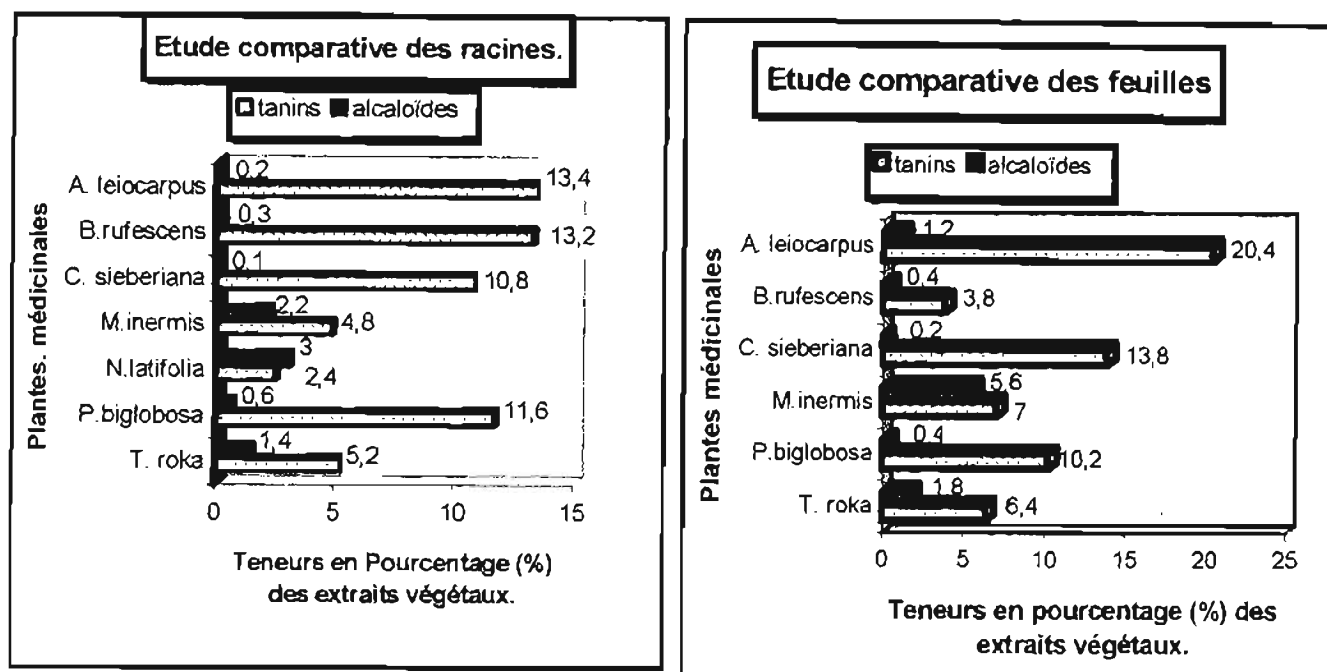
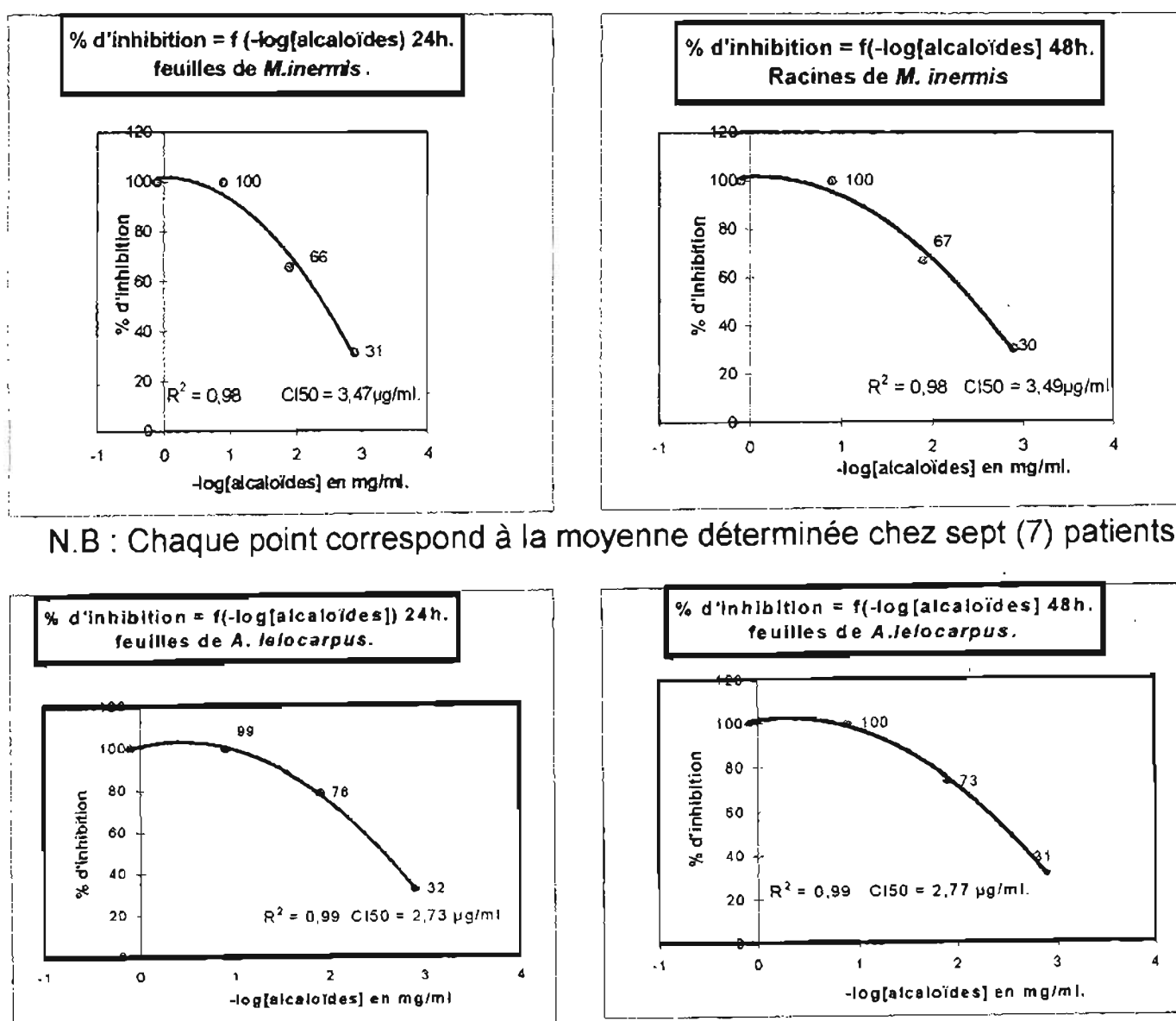


Figure 9 : étude comparative de la teneur en tanins et en alcaloïdes des plantes.

De cette étude, il ressort que *A. leiocarpus*, *C. sieberiana*, et *P. biglobosa* ayant des teneurs respectivement de 20,4 ; 13,8 et 10,2 au niveau des feuilles et de 13,4 ; 10,8 et 11,6 au niveau des racines, sont dans l'ensemble les plantes les plus riches en tanins. De même, *M. inermis*, *trichilia roka* et *N. latifolia* avec des teneurs en alcaloïdes de 0,56 et 0,18 (pour les deux premiers) au niveau des feuilles et de 0,22 ; 0,14 et 0,30 au niveau des racines, restent les plantes les plus riches en alcaloïdes. On note ainsi, suite à cette étude une répartition très inégale des tanins et des alcaloïdes dans les différentes espèces étudiées. Toutefois, ces résultats confirment les données de l'analyse qualitative des tanins et des alcaloïdes. Les teneurs en alcaloïdes contenues dans la figure 9, ont été multipliées par 10.

III.2°) Tests schizontocides réalisés sur les cultures de *Plasmodium falciparum in vitro*, prélevées chez les individus infestés.

Les CI50 des extraits obtenues à partir des tests réalisés avec les alcaloïdes de *Mitragyna inermis* et de *Anogeissus leiocarpus* (Figure 10), permettent de tirer les conclusions suivantes :



N.B : Chaque point correspond à la moyenne déterminée chez sept (7) patients.

Figure 10 : Détermination des CI50 des extraits alcaloïdiques de Plante.

Les quatre courbes d'inhibition (Figure 10), présentent aux concentrations d'extraits de 1,25 ; 12,5 et 125µg/ml des droites linéaires de corrélation négative. Les coefficients de corrélation de ces courbes sont supérieurs à 0,98 justifiant l'alignement du nuage de points. Au-dessus de 125µg/ml, on note pour les quatre courbes l'apparition d'un plateau. Nous reviendrons sur l'obtention de ce plateau au cours de la discussion. La CI50 des extraits a été déterminée à partir de la courbe d'équation de type : $y = ax^2 + bx + c$. Pour une inhibition de 50% de parasites, on pose $y = 50$ et on détermine x . La fonction inverse du logarithme décimale (10^x), permis d'obtenir les concentrations d'extraits inhibant la croissance de 50% de parasites (CI50).

Afin de déterminer l'activité antiplasmodique de nos extraits naturels de plante, nous avons eu recours aux critères établis par Rasoanaivo & *al.*, 1992. De ces critères, il ressort qu'un extrait naturel de plante est très actif sur *P. falciparum* lorsque sa CI50 < 50µg/ml. De même l'extrait est actif si : 50µg/ml < CI50 < 500µg/ml. Un extrait a une activité faible si : 500µg/ml < CI50 < 1000µg/ml et l'extrait est inactif lorsque la CI50 > 1000 µg/ml.

En utilisant ces critères comme référence pour classer l'activité des plantes testées sur les souches de *P. falciparum* prélevées chez les individus infestés, il ressort de notre étude, que les alcaloïdes extraits des feuilles et des racines de *M. inermis*, ceux extraits des feuilles de *Anogeissus leiocarpus*, ayant des CI50 comprises entre 2,5 et 4 µg/ml, donc largement inférieures à 50µg/ml, peuvent être considérés comme ayant une excellente activité inhibitrice sur la croissance du parasite (Figure 10). Ces résultats sont identiques à ceux obtenus par d'autres équipes ayant testé l'activité inhibitrice des alcaloïdes totaux de *M. inermis*, mais aussi de *Nauclea latifolia*, de *Holarrhena floribunda* etc. (Millogo, 1992, Coulibaly M., 1996).

Les alcaloïdes extraits des feuilles et des racines de *B. rufescens*, *C. sieberiana*, *P. biglobosa* et *T. roka*, ont présenté une activité antiplasmodique faible voir inexistante avec des CI50 variant de 500 à 2000 µg/ml. Pour raison de clarté du document, nous n'avons pas jugé nécessaire de présenter les courbes d'inhibitions de ces plantes ne présentant pas d'activité schizontocide remarquable.

Pour tous les tests schizontocides effectués avec les tanins, ceux extraits des feuilles et des racines de *Anogeissus leiocarpus* ont présenté après 24 et 48h d'incubation une bonne activité antimalarique avec des CI50 < 50µg/ml (Figure 11). Par contre, les tanins extraits des feuilles et des racines de *B. rufescens*, *C. sieberiana*, *M. inermis* et *T. roka*, ont présenté une activité antiplasmodique faible voir inexistante, avec des CI50 variant de 600 à 5000µg/ml. Pour raison de clarté du document, nous n'avons pas présenté les courbes d'inhibitions de ces plantes ne présentant pas d'activité schizontocide remarquable.

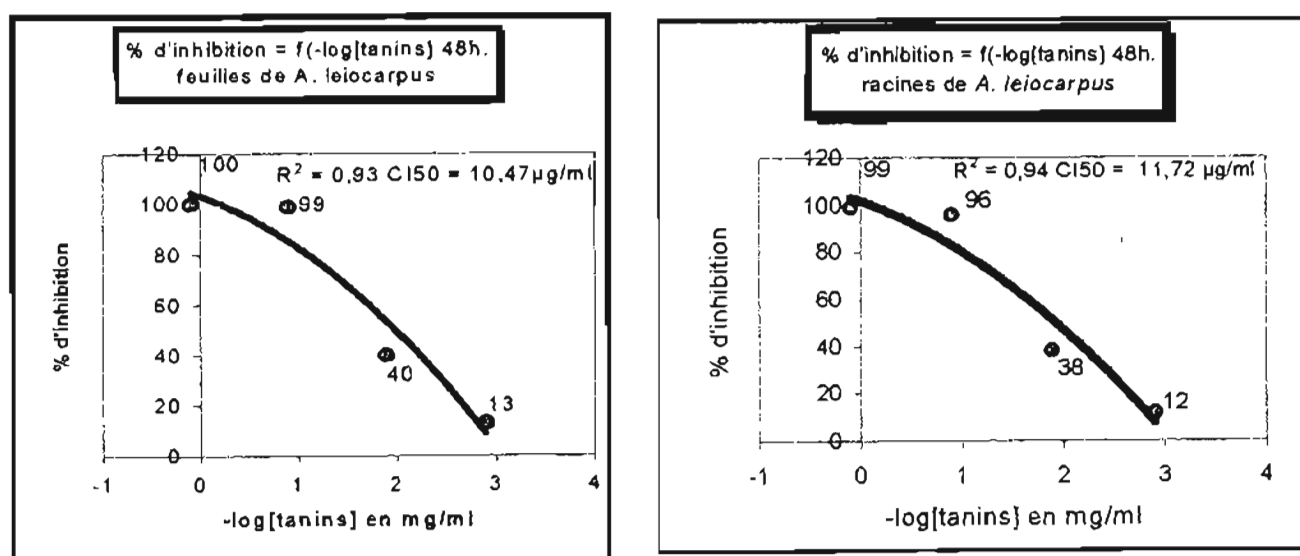


Figure 11 : Détermination des CI50 des tanins extraits de plante.

N.B : Chaque point correspond à la moyenne déterminée chez cinq (5).

Les lectures des lames ont été effectuées par deux lecteurs.

III.3°) Tests schizontocides réalisés sur les cultures continues de *Plasmodium falciparum* *in vitro*.

Les valeurs des CI50, obtenues après 24h d'incubation suite aux tests réalisés sur la souche chloroquino-résistante de *Plasmodium falciparum* W2, ainsi que les équations de droite de régression polynomiale d'ordre 2 (Figure 12), permettent de tirer les enseignements suivants :

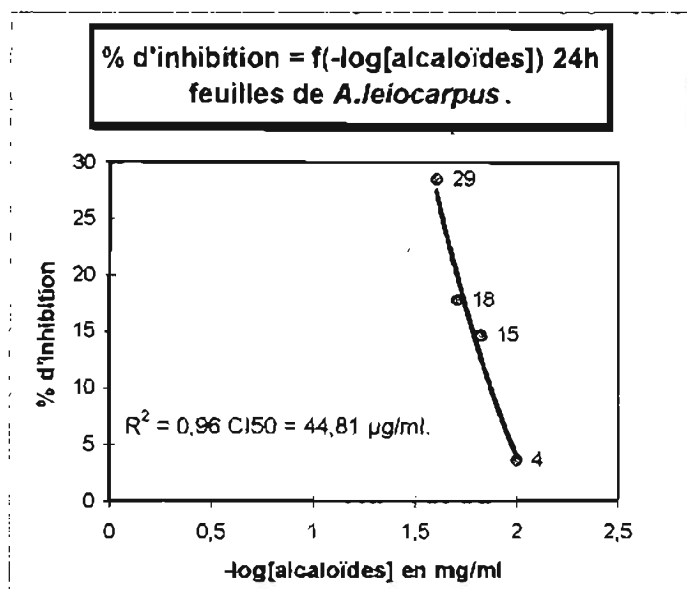
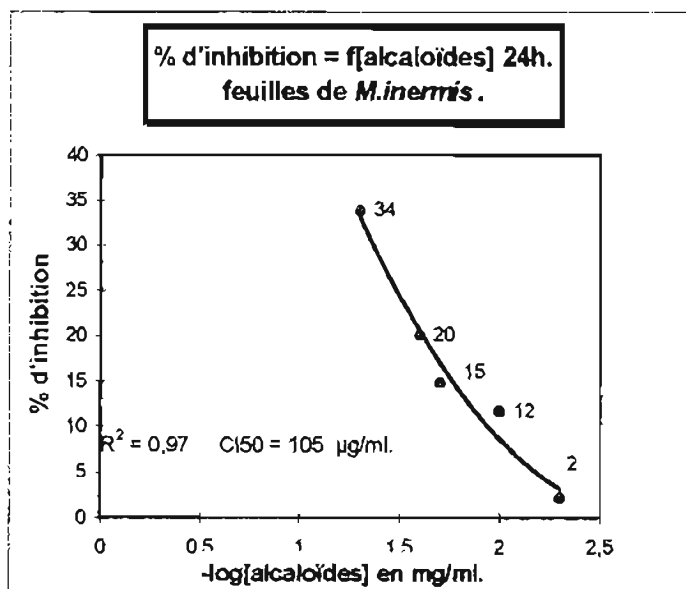
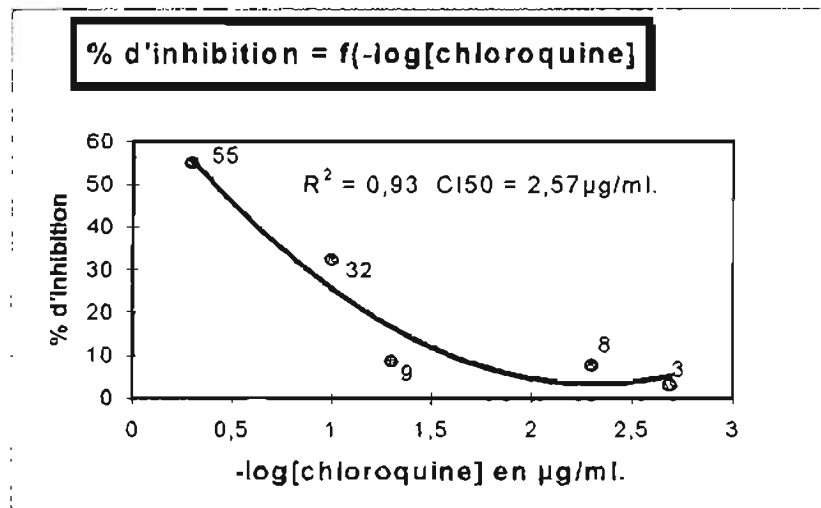


Figure 12: Détermination des CI50 de la chloroquine et d'extraits végétaux.

La courbe du % d'inhibition = $f(-\log[\text{chloroquine}])$, montre qu'aux concentrations 0,002 ; 0,005 et 0,01 $\mu\text{g/ml}$, il n'y a aucune inhibition de la chloroquine sur la souche chloroquino-résistante de *P. falciparum*. Cela se traduit par le plateau obtenu au bas de la courbe. L'effet de la chloroquine sur *P. falciparum* W2 commence à la concentration 0,05 $\mu\text{g/ml}$ et atteint une inhibition de 55% à la concentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Les courbes du % d'inhibition = $f(-\log[\text{alcaloïdes}])$ obtenues avec les feuilles de *M. inermis* et de *A. leiocarpus*, montrent respectivement une inhibition maximale de croissance de 34% et de 29% aux concentrations 0,05 et 0,025 $\mu\text{g/ml}$. La CI50 de la chloroquine obtenue suite au test réalisé sur *P. falciparum* W2, est 2,57 $\mu\text{g/ml}$, valeur largement supérieure à celles rencontrées dans la littérature.

Quand aux valeurs des CI50 des alcaloïdes de *A. leiocarpus* et de *M. inermis*, testées sur la souche de *P. falciparum* W2, elles sont respectivement de l'ordre de 44,81 et 105 $\mu\text{g/ml}$, soit 16 fois plus élevées (pour la première plante) et 30 fois plus élevées (pour la deuxième) que les valeurs des CI50 obtenues sur individus infestés. Nous reviendrons sur tous ces résultats au cours de la discussion.

III.4°) Evaluation de l'activité hémolytique des extraits.

L'activité hémolytique des extraits végétaux a été déterminée à partir d'une solution mère d'hémoglobine à 150 mg/ml, diluée au 1/100^{ème}.

Les concentrations à effets hémolytiques des alcaloïdes et des tanins sur les hématies humains ont été déterminées à partir de la courbe $\text{DO} = f(\text{taux d'hémoglobine à 1\%})$ (Figure 13).

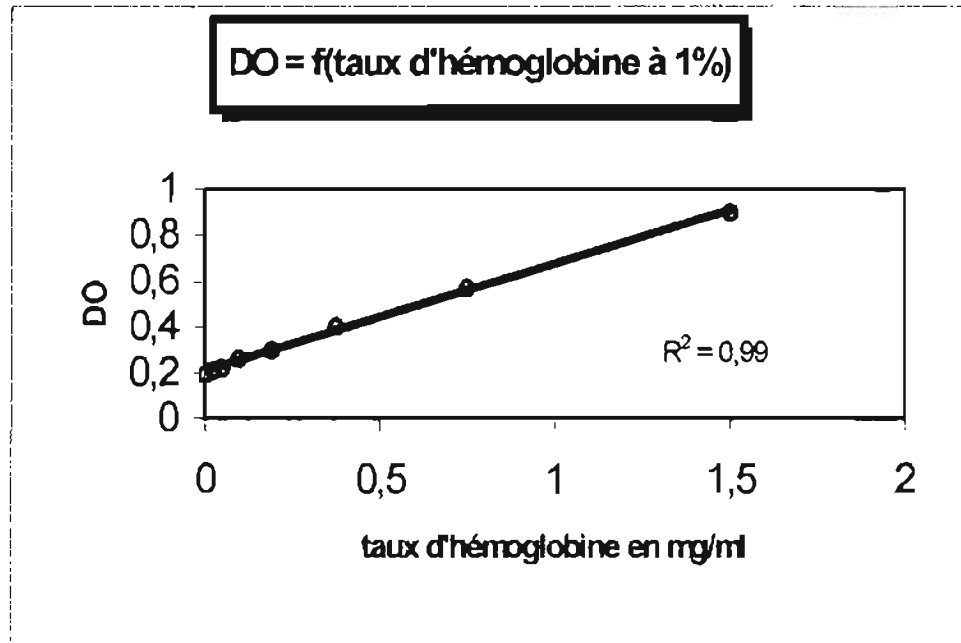


Figure 13 : courbe d'étalonnage établit à partir d'une solution d'hémoglobine à 1%.

Aux valeurs moyennes des DO des surnageants d'hématies du 1^{er} patient, nous avons retranché les DO des puits témoins, ainsi que celles du RPMI et du bruit de fond (tableau 4).

Concentrations d'extraits en µg/ml	1250	125	12,5	1,25
Extraits de Plantes	Mesure de l'absorbance de la solution d'hémoglobine diluée au 1/100 ^{ème} .			
Chloroquine	0,00	0,05	0,00	0,08
<i>M.inermis</i> (alc.feuille)	0,09	0,03	0,00	0,00
<i>M.inermis</i> (alc.racines)	0,06	0,01	0,00	0,00
<i>A.leiocarpus</i> (alc.feuille)	0,08	0,00	0,00	0,08
<i>M.inermis</i> (tan.feuille)	0,50	0,13	0,21	0,00
<i>M.inermis</i> (tan.racine)	0,45	0,43	0,00	0,03
<i>A.leiocarpus</i> (tan.feuille)	0,20	0,30	0,21	0,18
Témoins	0,01	0,00	0,00	0,05

Tableau 4 : Mesure par DO de la libération de l'hémoglobine à partir du sang du patient n°1, incubé pendant 24 heures en présence de divers extraits de plantes.

NB : Alc : alcaloïde tan : tanins

A partir de la courbe $DO = f(\text{taux d'hémoglobines à } 1\%)$, nous avons déterminé le taux d'hémoglobines libéré dans les solutions sanguines diluées au $1/100^{\text{ème}}$ (Tableau 5).

Concentrations d'extraits en $\mu\text{g/ml}$	1250	125	12,5	1,25
Extraits de Plantes	Taux d'hémoglobines (mg/ml) dans les solutions sanguines diluées au $1/100^{\text{ème}}$.			
Chloroquine	00	0,11	00	0,17
<i>M.inermis</i> (alc.feuille)	0,19	0,06	00	00
<i>M.inermis</i> (alc.racines)	0,13	0,02	00	00
<i>A.leiocarpus</i> (alc.feuille)	0,17	00	00	0,17
<i>M.inermis</i> (tan.feuille)	1,06	0,28	0,45	00
<i>M.inermis</i> (tan.racine)	0,96	0,91	00	0,06
<i>A.leiocarpus</i> (tan.feuille)	0,43	0,64	0,45	0,38
Témoins	02	00	00	10

Tableau 5 : Taux d'hémoglobines dans les solutions sanguines diluées du 1^{er} patient.

En tenant compte du facteur de dilution ($1/100^{\text{ème}}$), nous avons déterminé le taux d'hémoglobine dans les solutions sanguines non diluées à 150 mg/ml (Tableau 6).

Concentrations d'extraits en $\mu\text{g/ml}$	1250	125	12,5	1,25
Extraits de Plantes	Taux d'hémoglobines (mg/ml) dans les solutions sanguines non diluées.			
Chloroquine	00	11	00	17
<i>M.inermis</i> (alc.feuille)	19	06	00	00
<i>M.inermis</i> (alc.racines)	13	02	00	00
<i>A.leiocarpus</i> (alc.feuille)	17	00	00	17
<i>M.inermis</i> (tan.feuille)	106	28	45	00
<i>M.inermis</i> (tan.racine)	96	91	00	06
<i>A.leiocarpus</i> (tan.feuille)	43	64	45	38
Témoins	02	00	00	10

Tableau 6 : Taux d'hémoglobines libérés à partir du sang du 1^{er} patient.

N.B : En caractère gras, nous présentons le taux d'hémoglobines libéré par les extraits végétaux présentant un risque d'effets hémolytiques.

S'agissant de l'étude effectuée à partir du patient n°2, la procédure est identique à celle utilisée pour le patient n°1. Lorsque l'on retranche les DO des puits témoins et celles du RPMI et du bruit de fond, on obtient les résultats rapportés dans le tableau 7.

Concentrations d'extraits en µg/ml	1250	125	12,5	1,25
Extraits de Plantes	Mesure de l'absorbance de la solution d'hémoglobine diluée au 1/100 ^{ème} .			
Chloroquine	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.inermis</i> (alc.feuille)	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.inermis</i> (alc.racines)	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A.leiocarpus</i> (alc.feuille)	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>M.inermis</i> (tan.feuille)	0,30	0,00	0,00	0,00
<i>M.inermis</i> (tan.racine)	0,50	0,24	0,00	0,00
<i>A.leiocarpus</i> (tan.feuille)	0,25	0,26	0,01	0,00
Témoins	0,03	0,00	0,06	0,00

Tableau 7 : Mesure par DO de la libération de l'hémoglobine à partir du sang du patient n°2, incubé pendant 24 heures en présence de divers extraits de plantes.

A partir de la courbe DO = f(taux d'hémoglobines à 1%), nous avons déterminé le taux d'hémoglobines libéré dans les solutions sanguines diluées au 1/100^{ème} (Tableau 8).

Concentrations d'extraits en µg/ml	1250	125	12,5	1,25
Extraits de Plantes	Taux d'hémoglobines (mg/ml) dans les solutions sanguines diluées au 1/100 ^{ème} .			
Chloroquine	00	00	00	00
<i>M.inermis</i> (alc.feuille)	00	00	00	00
<i>M.inermis</i> (alc.racines)	00	00	00	00
<i>A.leiocarpus</i> (alc.feuille)	00	00	00	00
<i>M.inermis</i> (tan.feuille)	0,64	00	00	00
<i>M.inermis</i> (tan.racine)	1,06	0,51	00	00
<i>A.leiocarpus</i> (tan.feuille)	0,53	0,55	0,02	00
Témoins	0,06	00	0,12	00

Tableau 8 : Taux d'hémoglobines dans les solutions sanguines diluées du 2^{ème} patient.

En tenant compte du facteur de dilution (1/100^{ème}), nous avons déterminé le taux d'hémoglobine dans les solutions sanguines non diluées à 150 mg/ml (Tableau 9).

Concentrations d'extraits en µg/ml	1250	125	12,5	1,25
Extraits de Plantes	Taux d'hémoglobines (mg/ml) dans les solutions sanguines non diluées.			
Chloroquine	00	00	00	00
<i>M.inermis</i> (alc.feuille)	00	00	00	00
<i>M.inermis</i> (alc.racines)	00	00	00	00
<i>A.leiocarpus</i> (alc.feuille)	00	00	00	00
<i>M.inermis</i> (tan.feuille)	64	00	00	00
<i>M.inermis</i> (tan.racine)	106	51	00	00
<i>A.leiocarpus</i> (tan.feuille)	53	55	02	00
Témoins	06	00	12	00

Tableau 9 : Taux d'hémoglobines libérés à partir du sang du 2^{ème} patient.

N.B : En caractère gras, nous présentons le taux d'hémoglobines libéré par les extraits végétaux présentant un risque d'effets hémolytiques.

Aux doses utilisées pour les tests schizontocides, tout comme la chloroquine, les alcaloïdes extraits des feuilles et des racines de *M. inermis*, ainsi que ceux extraits des feuilles de *A. leiocarpus* ne présentent aucun effet de cytotoxicité sur les patients testés. Par contre, à ces concentrations (1250 et 125 µg/ml), nous avons vu précédemment que cela provoque une inhibition de croissance du parasite de presque 100% (Figure 10).

En revanche, pour les tanins extraits des feuilles et des racines de *M. inermis*, ainsi que pour ceux extraits des feuilles de *A. leiocarpus*, on observe un effet de toxicité très prononcé, provoquant une hémolyse intense. Exemple, les tanins extraits des racines de *M. inermis* provoque la libération d'un taux

d'hémoglobines de 106 mg/ml, cela correspond au 2/3 du taux d'hémoglobine normal d'un adulte en bonne santé.

En résumé, aux concentrations d'alcaloïdes testées (1,25 à 1250 µg/ml), on observe une excellente activité antiparasitaire (CI50 < 5µg/ml) (Figure 10) et une absence de risque d'effets hémolytiques (Taux d'hémoglobines presque identique à celui des puits témoins) (Tableaux 6 et 9).

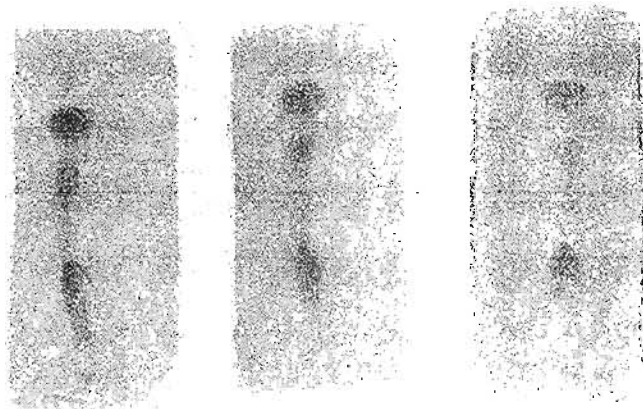
Aux concentrations des tanins testées (1,25 à 1250 µg/ml), on observe pour les tanins extraits des feuilles et des racines de *A. leiocarpus*, une bonne activité antiparasitaire (CI50 < 15 µg/ml) (Figure 11) et une activité hémolytique importante (Taux d'hémoglobines libéré variant de 38 à 64 mg/ml) (Tableaux 6 et 9). Les tanins extraits des feuilles et des racines de *M. inermis*, ne présentent pas d'activité antiparasitaire (CI50 > 1000µg/ml), mais renferment une activité hémolytique considérable (Taux d'hémoglobines variant de 28 à 106 mg/ml) (Tableaux 6 et 9).

Ces résultats sont d'une grande importance quant à l'orientation des tradithérapeutes pour une meilleure administration de leurs extraits de plantes médicinales. Ils permettent en effet, non seulement de leur recommander des doses à administrer aux malades, mais aussi des parties des plantes à utiliser. Notons enfin, que le faible taux d'hémoglobines obtenues au niveau des puits témoins pourrait s'expliquer par le phénomène de l'hémolyse spontanée des globules rouges.

III.5°) Chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits d'alcaloïdes totaux.

Les mélanges de solvants retenus pour la chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits d'alcaloïdes totaux des feuilles et des racines de *Mitragyna*

inermis, après révélation au réactif de Dragendorff est : acétate d'éthyl / diméthyl éther / ammoniac 12,5%, dans les proportions 55 / 40 / 5 pour les feuilles, et acétate d'éthyl / diméthyl éther / ammoniac 12,5%, dans les proportions 70 / 28 / 2 pour les racines. L'illustration est faite sur la figure 14.



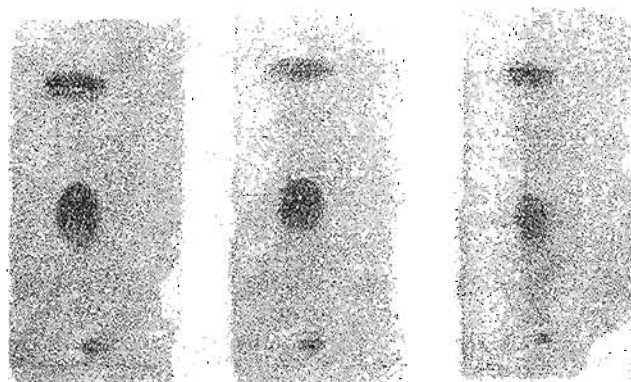
Feuilles de *M. inermis* (CCM)

acétate d'éthyl / diméthyl éther / ammoniac 12,5%

55

40

5



Racines de *M. inermis* (CCM)

acétate d'éthyl / diméthyl éther / ammoniac 12,5%

70

28

2

Figure 14 : CCM des alcaloïdes de *M. inermis*.

La CCM effectuée montre trois groupes d'alcaloïdes majeurs au niveau des feuilles et deux groupes d'alcaloïdes majeurs au niveau des racines. Les solvants de migration étant les mêmes, laissent penser qu'il pourrait y avoir des groupes d'alcaloïdes identiques aussi bien au niveau des feuilles que des racines et susceptibles d'être à l'origine de l'activité antiplasmodique observée. Une chromatographie sur colonne permettra de séparer ces différents groupes d'alcaloïdes et l'analyse en HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) ou en chromatographie échangeuse d'ions permettra de les identifier avec précision.

Discussion

L'objet de cette première partie de notre travail était de rechercher une activité schizontocide d'extraits naturels de sept (7) plantes médicinales utilisées dans la pharmacopée traditionnelle au Burkina Faso, pour leur effet fébrifuge.

Pour ce faire, nous nous sommes intéressés aux alcaloïdes et aux tanins, deux constituants majeurs qui interviennent le plus souvent dans les propriétés curatives des plantes. Après caractérisation et dosage de ces principes actifs, nous avons comme plantes de notre étude, celles qui ont présenté des fortes teneurs en tanins et en alcaloïdes.

Nous avons parallèlement analysé les effets de toxicité de ces constituants, par l'analyse de leur activité hémolytique sur les globules rouges humains.

Suivant leur provenance, les tanins ne présentent pas le même profil d'activité schizontocide. Ceux provenant des feuilles *A. leiocarpus* présentent une activité antiparasitaire (Figure 11), tandis que ceux provenant des feuilles et des racines de *M. inermis* n'ont présenté aucune activité antiparasitaire (CI 50 > 1000 µg/ml). Cette différence d'activité ne peut s'expliquer que par une différence des structures moléculaires reposant sur une complexité de la structure des tanins en général.

Les tanins ont présenté un effet hémolytique très intense. L'activité fortement hémolytique des tanins, pourrait s'expliquer par leur pouvoir astringent. En effet, ces composés de nature polyphénolique ont la propriété de précipiter les protéines du collagène de la peau, d'où leur utilisation courante dans l'industrie du cuir. Ces composés pourraient ainsi contracter des liaisons avec les protéines membranaires des globules rouges, provoquant ainsi l'éclatement de ceux-ci, avec pour conséquence la libération de l'hémoglobine.

Les propriétés antibactériennes, antifongiques et antiparasitaires des tanins, ont été respectivement démontrées par Scalbert (1991), Malmberg (1980) et Nkunya (1992). Toutefois, des résultats similaires aux nôtres, concernant la cytotoxicité de ces molécules, ont été démontrés par ces différentes équipes.

C'est ainsi que certains polyphénols (dérivés des tanins) comme le lapachol ou le gossipol, ont montré une activité antiplasmodique supérieure à celle de la chloroquine, mais leur toxicité en limite l'usage.

L'activité schizontocide des alcaloïdes, suivant leur provenance, présente un effet maximum d'activité inhibitrice pour les concentrations comprises entre 1,25 et 0,125 mg/ml sur les souches de *Plasmodium falciparum* provenant d'individus infestés.

Les valeurs des CI50 obtenues à partir du test d'inhibition réalisé sur la souche en culture continue de *P. falciparum* W2 sont beaucoup plus élevées que celles obtenues sur individus infestés, pour diverses raisons. La principale raison est liée au fait que nous avons réalisé les tests d'inhibition sur les cultures asynchrones, c'est-à-dire sur les différentes formes asexuées du parasite (trophozoïtes, schizontes et gamétocytes).

La majorité des alcaloïdes, y compris la chloroquine sont des lysosomotropes. Ces bases faibles se concentrent de façon irréversible dans la vacuole digestive du parasite de pH acide, bloquant ainsi la dégradation enzymatique de l'hémoglobine. Elles agissent particulièrement sur les formes en anneau (trophozoïtes) du parasite, en inhibant les protéases parasitaires, bloquant ainsi la dégradation de l'hémoglobine et par voie de conséquence, la non différenciation du trophozoïte en schizonte (Le Bras & al., 1992). C'est pourquoi, nous aurions dû synchroniser les souches au stade trophozoïtique avant la mise en culture. Une autre des raisons pour lesquelles nous avons obtenu des CI50 élevées, est liée au fait que la souche de *P. falciparum* W2 est chloroquino-résistante. La chloroquine est l'antipaludique majeur le plus couramment utilisé dans la thérapie antipalustre. Sa bonne tolérance vis-à-vis des globules rouges aussi bien *in vitro* qu' *in vivo*, reste indiscutable. Ce résultat concernant la bonne tolérance des alcaloïdes par les globules rouges, justifie l'utilisation de plusieurs molécules antipaludiques de nature alcaloïdique dans le traitement du paludisme. Dans cet ordre d'idée, la tétrandrine isolée chez

Stephania tetrandra (Ye & Van Dyke, 1989), de même que l'artémisinine ou quinghaosu, isolée des feuilles de *Artemisia annua* (Bougnoux & Ancelle, 1993), sont des composés de nature alcaloïdique longtemps utilisés dans la médecine chinoise et qui de nos jours, restent des composés très efficaces sur les souches chloroquino-résistantes de *P. falciparum*. Il en est de même pour la pyronaridine, un autre alcaloïde utilisé dans la pharmacopée chinoise et actuellement utilisé au Cameroun dans le traitement des accès palustres (Ringwald & al., 1996), ainsi que de la malagashanine, autre molécule antipaludique de nature alcaloïdique utilisée dans la pharmacopée malgache (Caira & al., 1995).

En résumé, les alcaloïdes extraits des feuilles de *M.inermis* et de *A. leiocarpus*, ainsi que ceux extraits des racines de *M.inermis* peuvent être administrés aux concentrations 1250 et 125 µg/ml (Concentrations inhibant la croissance du parasite de presque de 100%), sans risque d'effets hémolytiques. Un tel résultat est d'une importance capitale dans l'orientation de l'étude *in vivo* de ces extraits.

S'agissant de *M. inermis*, le principe actif se trouvant aussi bien au niveau des feuilles que des racines, les tradithérapeutes pourraient se limiter à l'usage des feuilles dans la mesure où, l'utilisation des racines provoque à court ou à long terme, une disparition certaine de la plante médicinale.

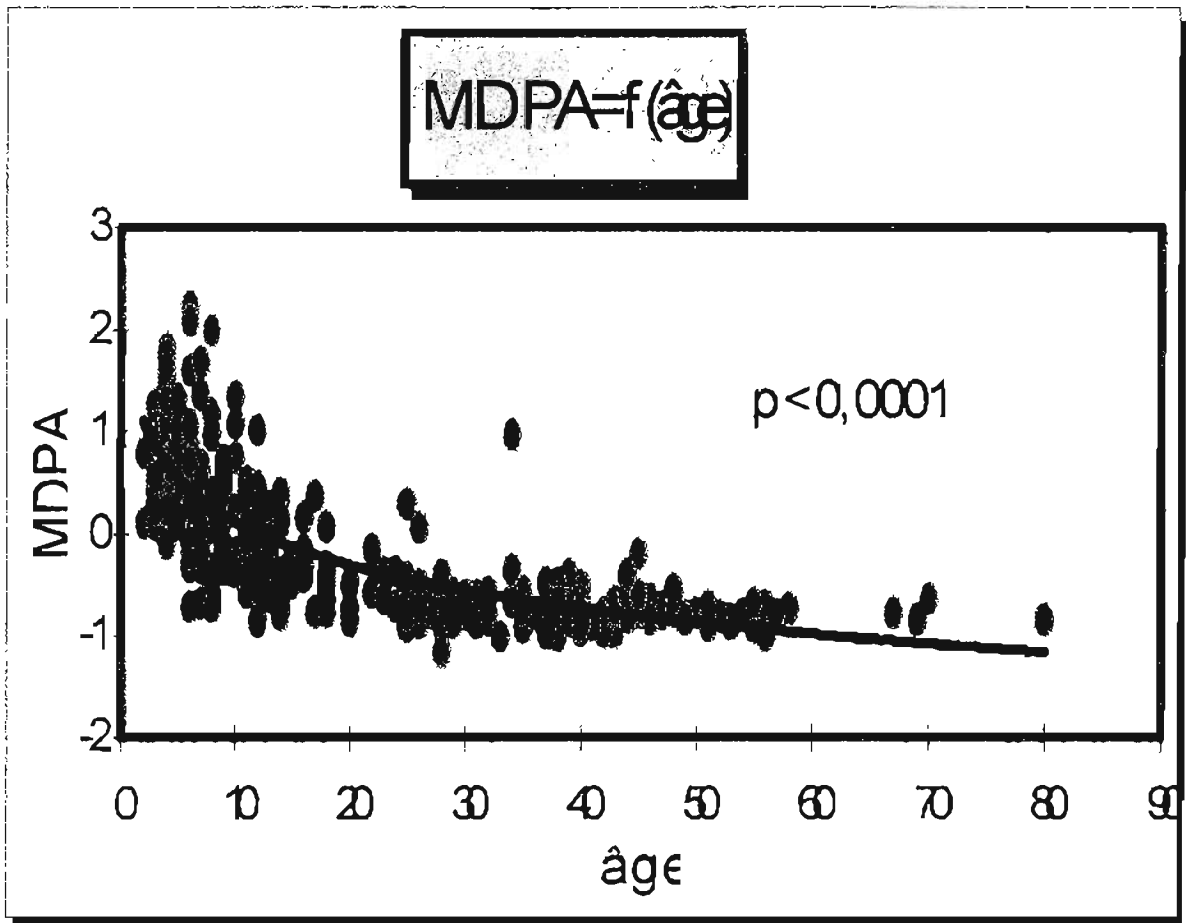
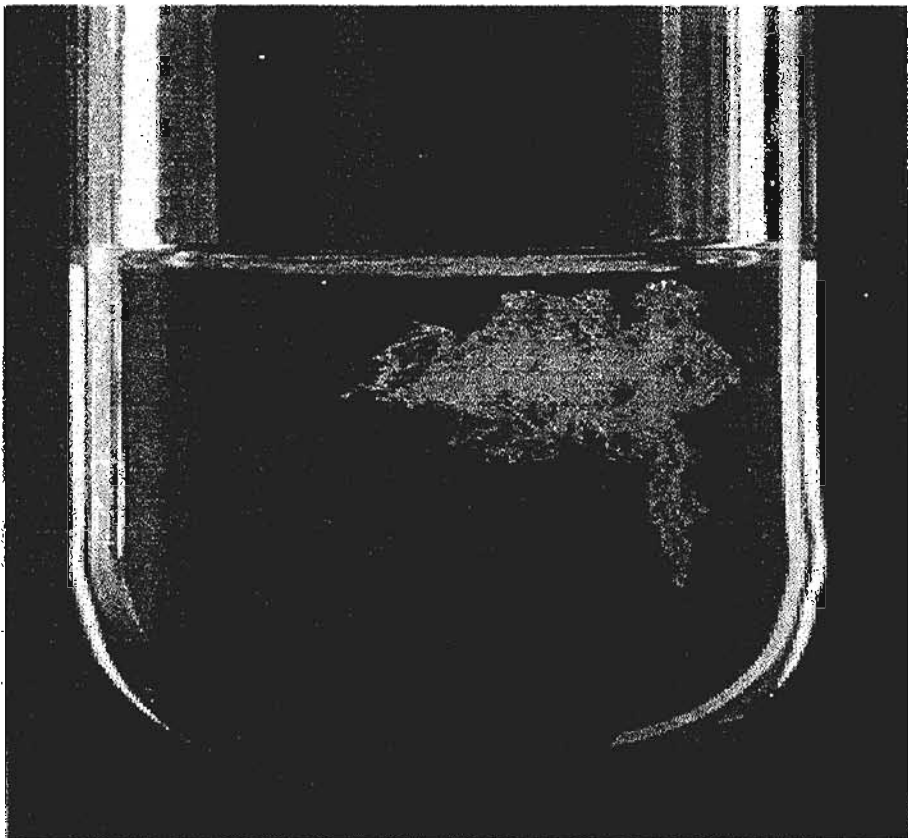


Figure 15 : $MDPA = f(\hat{age})$.

La classe d'âge (0 à 10 ans) contient les charges parasitaires les plus élevées, cela s'explique par le fait que ces enfants n'ont pas encore un système immunitaire très élaboré pouvant leur permettre de lutter contre la maladie infectieuse. Entre 10 et 20 ans, on observe une baisse significative de la parasitémie et cela est dû à la capacité du système immunitaire de cette tranche d'âge de lutter efficacement contre les maladies. Après 30 ans, le système immunitaire des individus étant très élaboré, on observe la formation d'un plateau.

III.7°) Extraction d'ADN à haute force ionique.

Le précipité d'ADN (Figure 16), de couleur blanchâtre, que le langage du laboratoire assimile à une méduse est présenté sous forme super enroulée. Au total, l'ADN de 339 individus parasités a été extrait.



Précipité d'ADN sous forme de méduse.

Figure 16 : Précipité d'ADN

III.8°) Contrôle de qualité de l'ADN

L'intégrité des molécules d'ADN est testée par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Le profil de migration (Figure 17), permet d'apprécier la qualité de la préparation. Aux deux extrémités se trouvent le marqueur de taille (DNA ladder). Entre les deux marqueurs de taille se trouvent les ADN de quelques individus de l'étude.

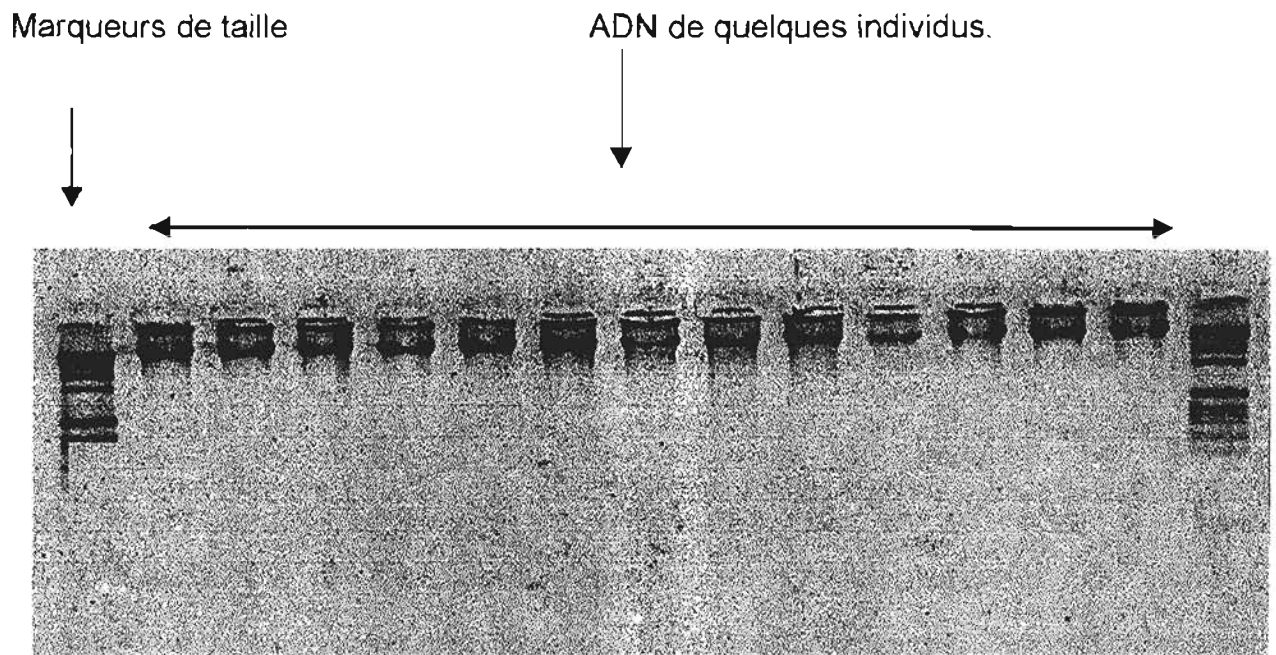


Figure 17 : Contrôle de qualité de l'ADN.

Lorsque la molécule d'ADN est dégradée, elle migre sous forme de traînée (smear), perturbant ainsi l'amplification par PCR. Des nucléases endogènes et exogènes (d'origine bactérienne par exemple) restent les plus incriminées. C'est pourquoi, il est fortement conseillé de travailler à basse température (4°C), température minorant l'activité des nucléases.

III.9°) Contrôle de la taille des fragments amplifiés.

Après amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction), les échantillons renfermant les fragments d'ADN sont soumis à une électrophorèse en gel (Figure 18). Connaissant la taille en pb du fragment d'ADN attendu, après amplification par PCR, on vérifie d'abord si la taille correspond à celle indiquée sur le marqueur de taille. Par exemple, pour le marqueur microsatellite D5S642, la taille du fragment attendu est 183/201 pb. Sur la figure 18, le fragment amplifié est situé juste au-dessous de la 2^{ème} bande (de bas en haut) du marqueur de taille, c'est-à-dire aux environs de 201 pb. Ce résultat est en accord avec la taille du fragment attendu.

Taille (pb) des fragments d'ADN amplifiés par PCR

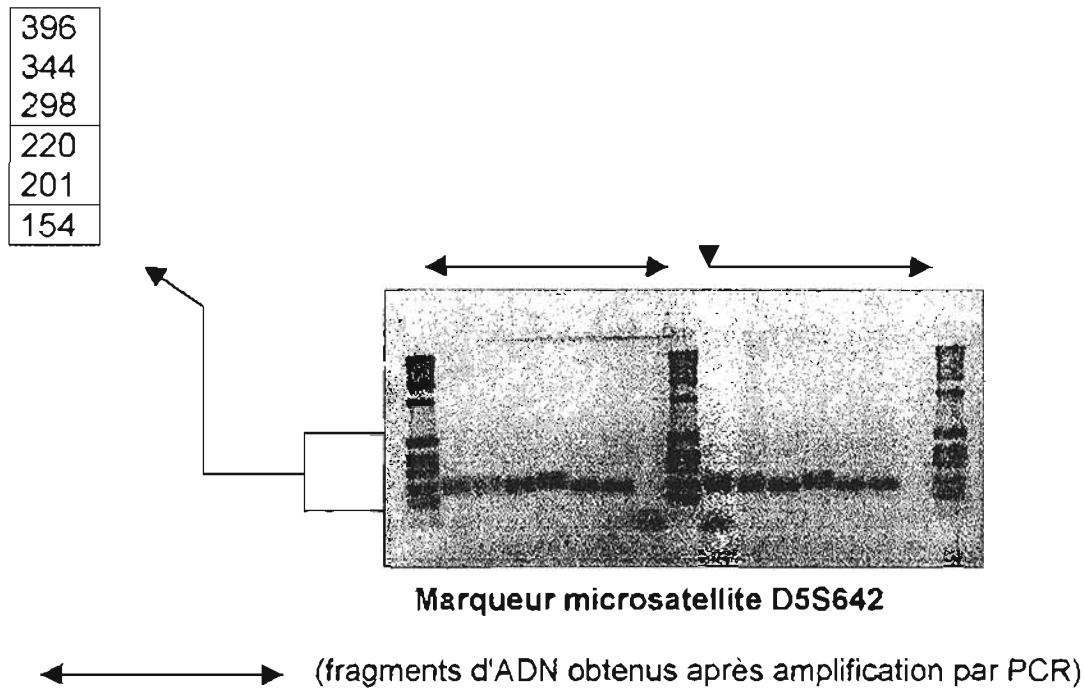
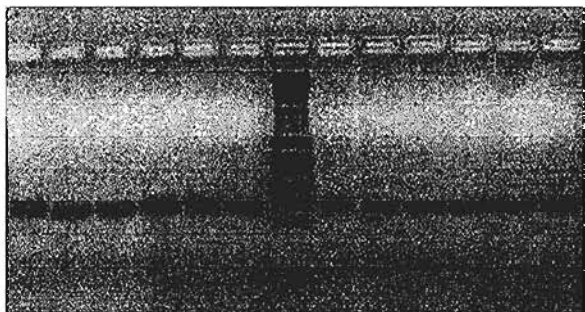
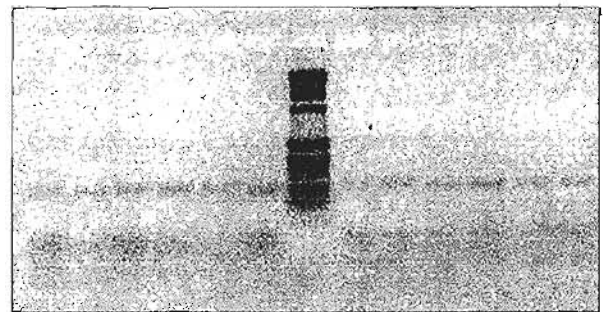


Figure 18 : Marqueur microsatellite (D5S642) amplifié par PCR.

Nous présentons dans la figure 19, les fragments d'ADN de quatre marqueurs microsatellites obtenus après amplification par PCR.



Marqueur microsatellite D5S399 amplifié.

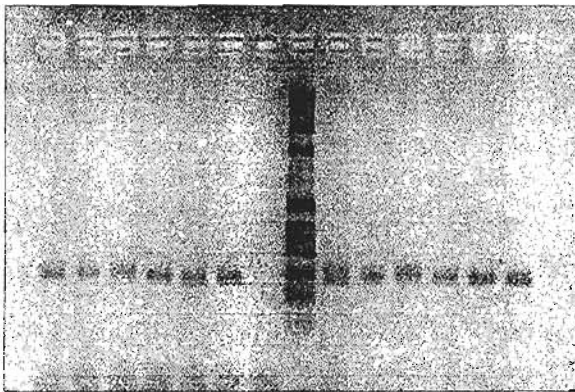


Marqueur microsatellite D5S2012 amplifié.

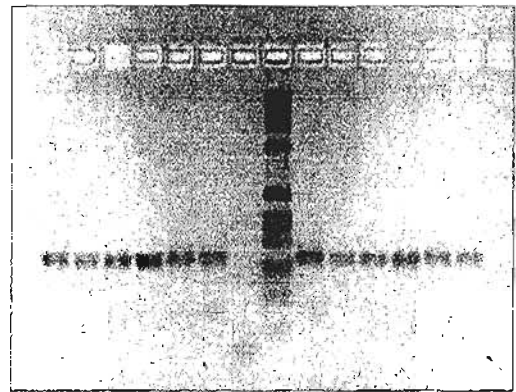
Figure 19 : Marqueurs microsatellites (D5S399 et D5S2012) amplifiés par PCR.

Pour ces deux marqueurs microsatellites, les tailles des fragments attendus sont respectivement de (116/132 pb) pour D5S399 et (192/216 pb) pour D5S2012. En se référant au marqueur de taille, les tailles des fragments obtenus correspondent bien aux tailles des fragments attendus.

Pour les marqueurs microsatellites D5S2090 et D5S436, les tailles des fragments attendus sont respectivement de (189/205 pb) et de (234/254 pb) (Figure 20). En se référant au marqueur de taille, les tailles des fragments obtenus correspondent bien à celles attendues.



Marqueur microsatellite D5S2090 amplifié



Marqueur microsatellite D5S436 amplifié

Figure 20 : Marqueurs microsatellites (D5S2090 et D5S436) amplifiés par PCR.

Les cinq autres marqueurs génétiques (D5S393, D5S487, D5S636, D5S658, et D5S2117) utilisés pour l'analyse des microsatellites, ont donné des résultats similaires. Pour raison de clarté du document, nous n'avons pas jugé nécessaire de les présenter.

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés est d'une importance capitale, dans la mesure où, elle permet de détecter les amplifications parasites dues aux éventuelles erreurs de la Taq polymérase, mais aussi aux mauvaises conditions d'amplifications. Le choix de la température d'hybridation des amorces ainsi que les quantités de dNTP et d'amorce doivent être strictement

contrôlées. Les conditions optimales d'amplification doivent être déterminées expérimentalement.

III.10°) Dosage spectrophotométrique et fluorimétrique des ADN.

Les concentrations d'ADN des individus de l'étude ont été déterminées aussi bien par spectrophotométrie (Concent DO en $\mu\text{g/ml}$) que par fluorimétrie (Concent fluo en $\mu\text{g/ml}$). Dans le tableau 11, un exemple de nos résultats concernant la quantité et la pureté des ADN est donné. La totalité des résultats se trouve en annexe (page 1 à 8).

FAMILLE	INDIVIDU	DO260/DO280	Concent(DO)en $\mu\text{g/ml}$	Concent(fluo) en $\mu\text{g/ml}$
50	502	2,11	200	217
50	503	2	200	206
50	504	2,04	290	348
50	505	1,95	98	90
50	506	2	75	62
50	507	1,89	180	184
50	509	1,96	138	142
50	511	2,06	88	72
50	512	2,04	378	433
50	513	1,91	273	289
51	515	2	75	68
51	516	1,62	53	56
51	517	1,94	175	208
51	518	1,95	185	175
51	519	1,97	143	140
51	520	1,94	248	283

Tableau 11 : Résultats des dosages spectrophotométrique et fluorimétrique des ADN en $\mu\text{g/ml}$.

III.10.1 Gamme étalon du dosage fluorimétrique des ADN.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée pour déterminer les concentrations d'ADN des individus de l'étude par la méthode fluorimétrique (Figure 21). Un ADN pur du phage λ ($2\mu\text{g/ml}$) a été utilisé comme molécule de référence.

On prépare une solution de cet ADN à une concentration de 800 ng/ml, puis on effectue des dilutions successives au $\frac{1}{2}$.

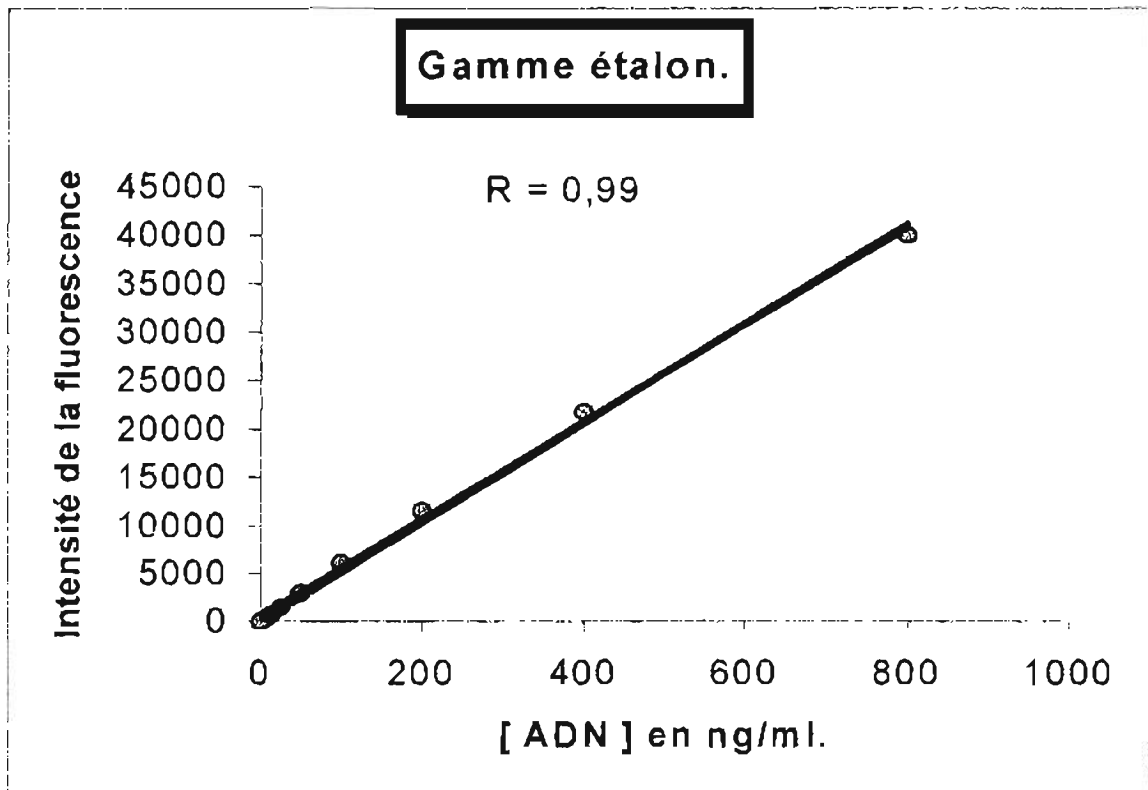


Figure 21 : Courbe étalon du dosage fluorimétrique des ADN.

La relation (Figure 21) est parfaitement linéaire pour les concentrations en ADN du phage λ comprises entre 0 et 400 ng/ml. Entre 400 et 800 ng/ml, il n'y a plus proportionnalité entre l'intensité de la fluorescence et la concentration en ADN. C'est pourquoi, les échantillons ayant des concentrations en ADN supérieures à 400ng/ml, ont été redosés en utilisant des dilutions beaucoup plus forte (1000 à 3000 fois) et calculés sur la partie linéaire de la courbe (Figure 21). Plusieurs séries de dosage ont été effectuées et pour chaque série une courbe étalon a été réalisée.

III.10.2 Recherche de corrélation entre les deux méthodes de dosage des ADN.

A partir de la courbe $\text{Conc DO} = f(\text{Conc fluo.})$, nous avons déterminé le coefficient de corrélation (R), la p-value (à partir du test "t" de student) et avons apprécié l'alignement du nuage de points (Figure 22).

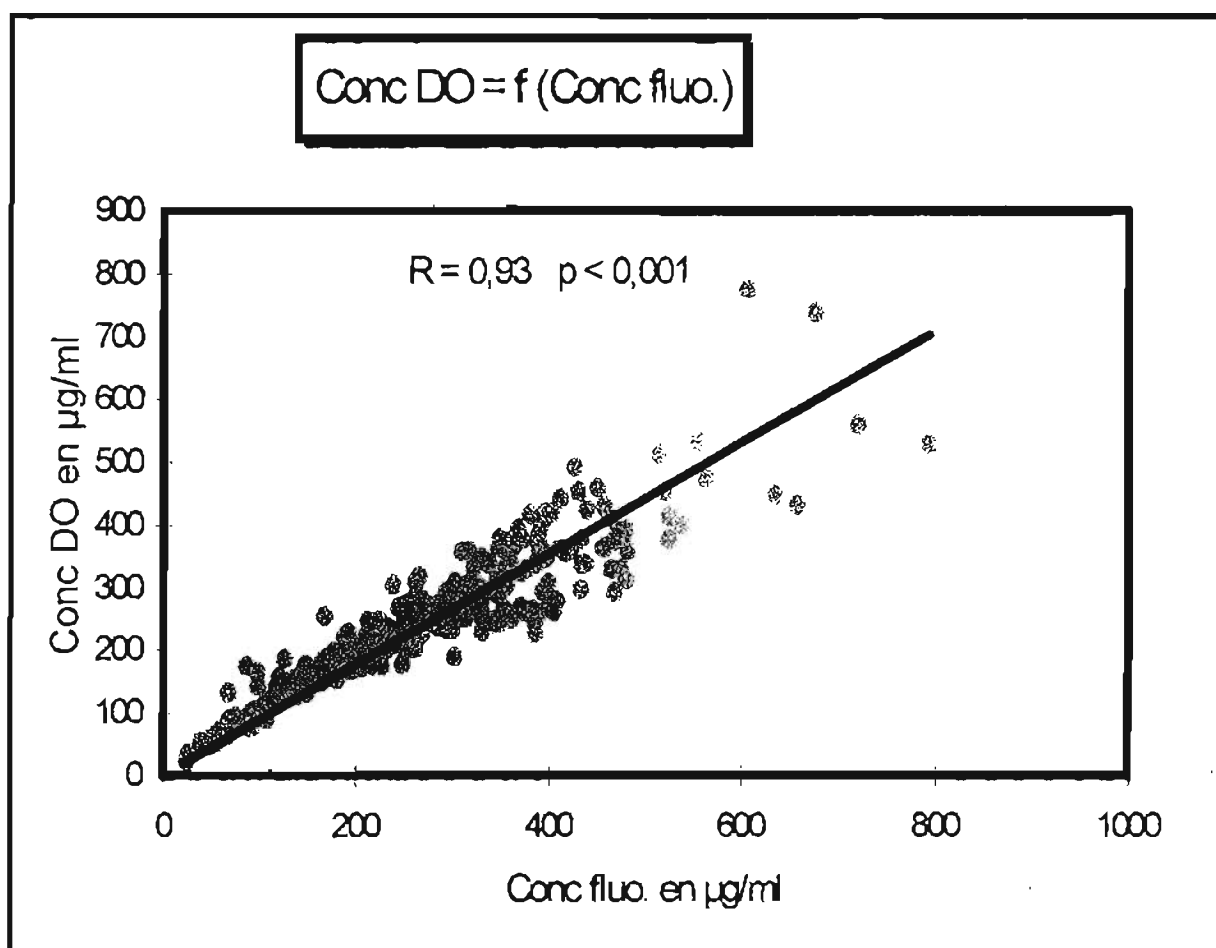


Figure 22 : Corrélation entre les deux méthodes de dosage.

A l'issue du dosage spectrophotométrique et fluorimétrique, les concentrations en ADN corrént parfaitement ($R = 0,93$; $p < 0,001$). Selon les informations que nous avons recueillies dans la littérature (PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent and kits. Interchim, 1998), la méthode de dosage des ADN par spectrophotométrie est moins sensible que celle par fluorimétrie. Cette baisse de sensibilité pourrait être due aux interférences moléculaires que peuvent

provoquer certains contaminants contenus dans la solution d'ADN et capables d'absorber aussi bien à 260nm, longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques qu'à 280nm. Des contaminants de nature protéique semblent bien indiqués pour jouer ce rôle.

La méthode de dosage des ADN par fluorimétrie est très spécifique, seules les molécules d'ADN ayant fixé l'agent intercalent émettent une fluorescence, les contaminants n'ayant pas cette propriété n'interféreront pas sur les résultats. Les concentrations en ADN obtenues par les deux méthodes de dosage étant en parfait accord, nous pouvons dire que la méthode spectrophotométrique est aussi une méthode sensible pour le dosage des acides nucléiques et non une simple estimation des concentrations en acides nucléiques telles que décrites dans la littérature (PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent and kits. Interchim, 1998). Pour réaliser un dosage satisfaisant d'ADN par spectrophotométrie tel que celui que nous avons effectué, les manipulations doivent être de rigueur. Il est important de procéder à une bonne extraction des ADN en respectant scrupuleusement toutes les étapes, les lavages en particulier. Ce résultat est en accord avec la concentration en ADN des échantillons (4 µg/ml) utilisée pour l'amplification par PCR. A cette concentration, les amplifications parasites peuvent être évitées.

III.11°) Génotypage

Nous avons déterminé les génotypes de 179 individus (enfants et leurs parents), répartis dans 62 familles. Nous avons utilisé un système de codage des allèles correspondant à l'ADN contrôle (Figures 23 à 26). On affecte le chiffre 0 à l'allèle correspondant au fragment le plus court de l'ADN contrôle et aux autres allèles, un chiffre positif correspondant au nombre de nucléotides supplémentaires pour les allèles correspondants aux fragments migrant plus lentement.

Un chiffre négatif est attribué aux allèles correspondant à des fragments migrant plus rapidement que l'allèle le plus court de l'ADN contrôle.

Nous rapportons dans les figures 23 à 26, la ségrégation allélique des marqueurs microsatellites obtenue avec la famille 76.

Marqueur D5S399.

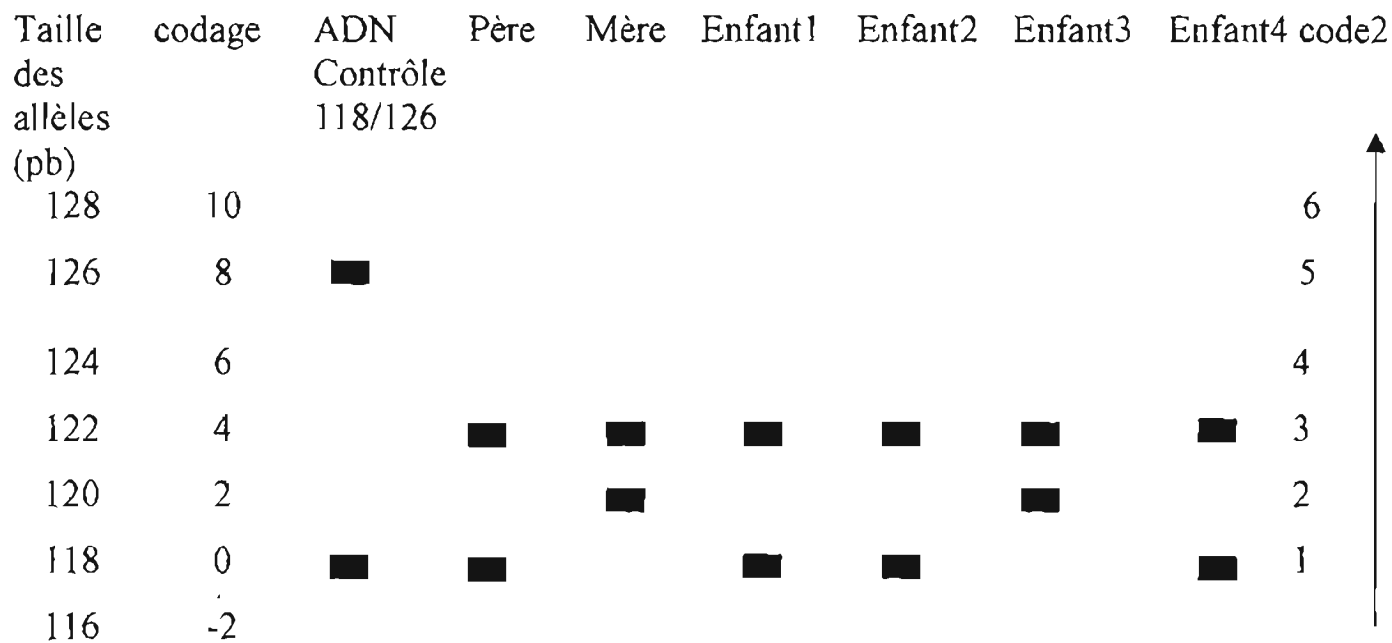
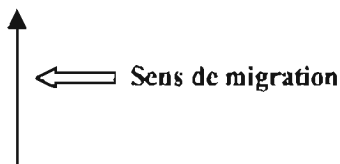


Figure 23 : Génotypes obtenus avec le marqueur D5S399.



Ce marqueur génétique (D5S399), montre que les quatre enfants issus de cette famille sont tous hétérozygotes et ont hérité chacun d'un allèle de leur parent. La taille (pb) de chaque allèle est déterminée à partir des allèles de l'ADN de référence (mère 134702). Ces différents allèles sont obtenus après amplification des régions microsatellites par PCR, suivi d'une séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide dénaturant, hautement discriminatif de type gel de séquence.

Marqueur D5S436.

Taille des allèles (pb)	codage	ADN Contrôle 238/244	Père	Mère	Enfant1	Enfant2	Enfant3	Enfant4	code2
246	8								6
244	6	■	■	■		■	■		5
242	4								4
240	2								3
238	0	■		■	■			■	2
236	-2		■		■	■		■	1
234	-4								

Figure 24 : Génotypes obtenus avec le marqueur D5S436.

Trois enfants (enfants 1 ; 2 et 4) sont hétérozygotes, seul l'enfant 3 est homozygote pour le marqueur étudié.

Marqueur D5S642.

Taille des allèles (pb)	codage	ADN Contrôle 185/185	Père	Mère	Enfant1	Enfant2	Enfant3	Enfant4	code2
193	8								5
191	6			■		■	■		4
189	4								3
187	2		■	■	■	■	■	■	2
185	0	■							1
183	-2								

Figure 25 : Génotypes obtenus avec le marqueur D5S642.

Deux enfants sont homozygotes (enfants 1 et 4) et deux hétérozygotes (enfants 2 et 3).

Marqueur D5S2090.

Taille des allèles	codage	ADN Contrôle 189/189	Père	Mère	Enfant1	Enfant2	Enfant3	Enfant4	Code2
197	8								7
195	6		■				■		6
193	4								5
191	2			■		■	■		4
189	0	■	■		■	■		■	3
187	-2								2
185	-4			■	■			■	1
183	-6								

Figure 26 : Génotypes obtenus avec le marqueur D5S2090.

Tous les enfants sont hétérozygotes pour le marqueur étudié. Soulignons que pour les quatre marqueurs présentés, les tailles des allèles (pb) obtenues correspondent bien à celles attendues, il en est de même pour les six autres marqueurs de l'étude.

Dans le but de faciliter les analyses statistiques, un deuxième système de codage consiste à attribuer le chiffre 1 au plus petit allèle de l'ensemble de la population et les chiffres 2 ; 3 ; 4 ; 5 etc. aux allèles supplémentaires (voir code2, figure 26). Par exemple, pour le marqueur D5S2090, on obtient les génotypes suivants : père (6/3), mère (4/1), enfant1 (3/1), enfant2 (4/3), enfant3 (6/4) et enfant4 (3/1). Ce sont ces génotypes qui seront utilisés.

III.11.1 Ségrégation familiale des marqueurs microsatellites.

La correspondance des génotypes des enfants avec ceux de leurs parents a été vérifiée pour l'ensemble des marqueurs. Les haplotypes ont été déterminés. Les allèles parentaux manquants ont suivant les cas, été reconstitué. Parmi les 179 enfants génotypés, 7 possèdent un génotype qui ne correspond pas avec celui de l'un des parents, ils ont donc été écartés de l'analyse de liaison génétique. La recherche des individus qui ont reçu des chromosomes recombinés permet d'apprécier l'indépendance de la transmission des allèles et de mesurer le taux de recombinaison génétique si les gènes sont liés. Les pedigrees obtenus à partir des familles 65 ; 76 ; et 107, illustrent les différents cas de figure (Figures 27 à 29).

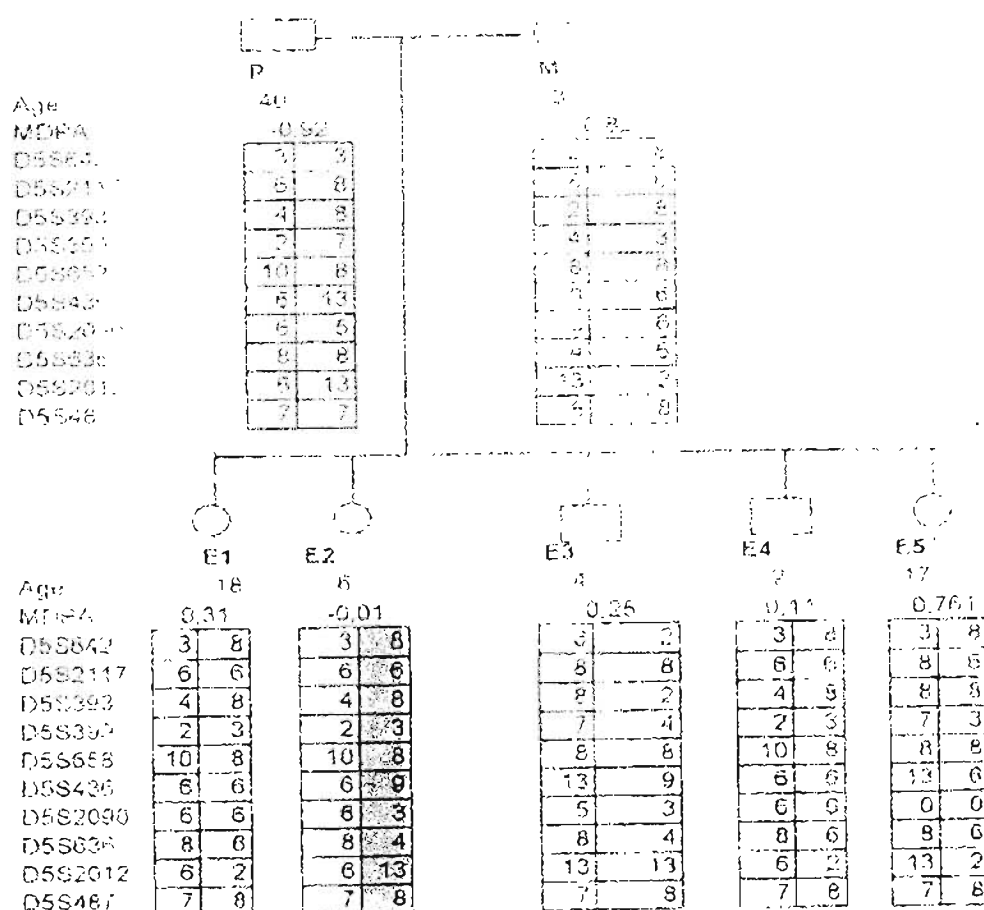


Figure 27 : Pedigree de la famille 65.

Dans le pedigree de la famille 65, quatre enfants (E1, E3, E4 et E5) ont hérité chacun d'un allèle de leur parent. La fille E2 renferme un allèle identique à l'un des allèles de son père et son deuxième allèle (en gris) est différent des allèles de ses parents.

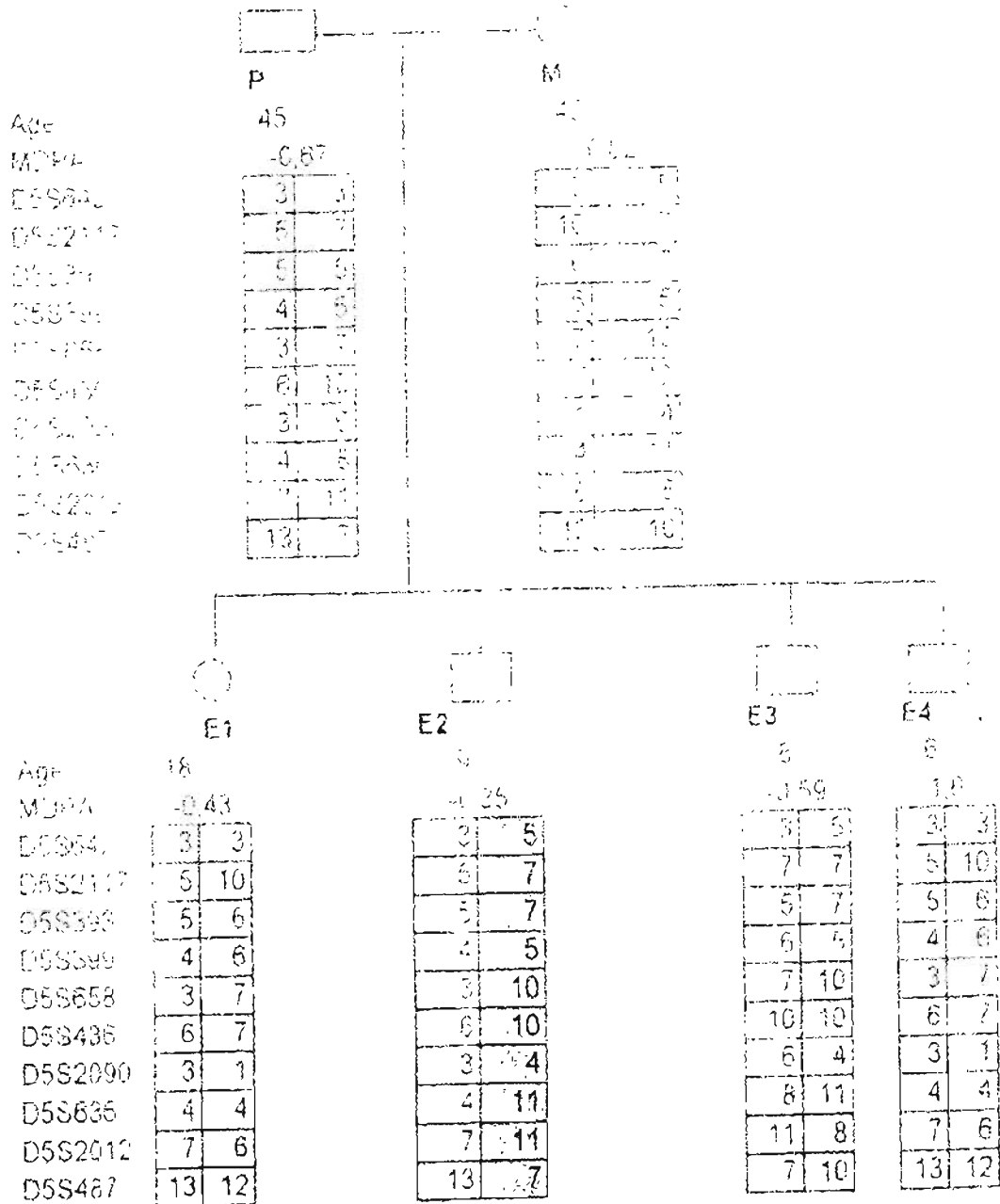


Figure 28 : Pedigree de la famille 76.

Dans la famille 76, trois enfants (E1, E3 et E4) ont hérité chacun d'un allèle de leur parent. Le garçon E2 renferme un allèle identique à l'un des allèles de son père et son deuxième allèle (en gris) est différent des allèles de ses parents.

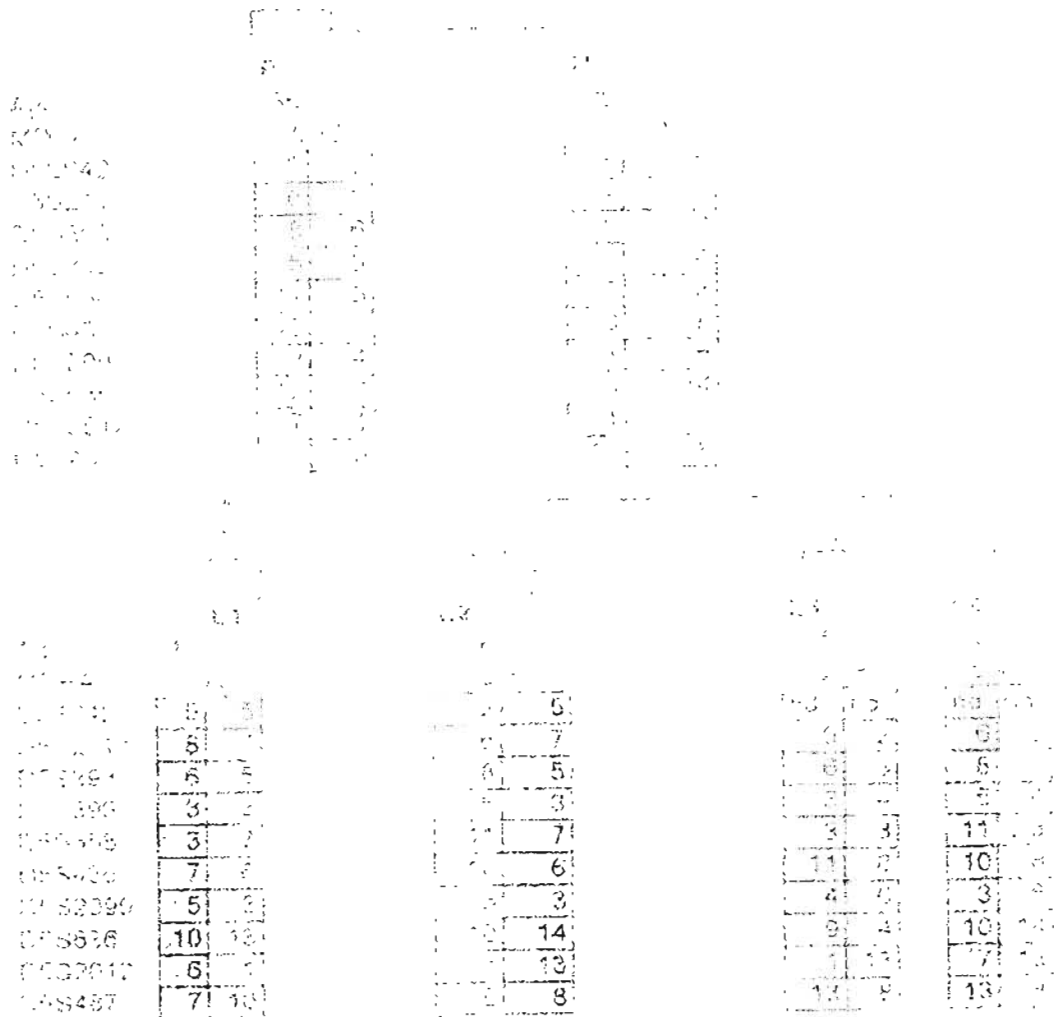


Figure 29 : Pedigree de la famille 107.

nd : non déterminé.

Dans la famille 107, la fille E3 a hérité d'un allèle de chacun de ses parents. Le garçon (E1) présente une incompatibilité entre l'un de ses deux allèles (en gris) et les allèles parentaux, la transmission allélique des parents à cet enfant n'est pas respectée. Dans ces conditions, le père présenté dans ce pedigree n'est

pas le père géniteur de l'enfant E1, on élimine donc cet enfant de l'étude. La fille (E4) renferme un allèle identique à l'un des allèles de sa mère et son deuxième allèle (en gris) est différent de celui de ses parents. Le garçon E2 renferme un allèle identique à l'un des allèles de son père, tandis que son deuxième allèle est différent de celui de ses parents (en gris).

Dans ces trois familles, des remaniements chromosomiques (phénomène de crossing-over) sont observés au niveau de l'un des allèles de certains enfants. Ces remaniements chromosomiques permettent de déterminer le taux de recombinaison génétique. Ce taux permet d'apprécier l'indépendance ou la non indépendance de la transmission allélique des gènes. Dans le deuxième cas de figure, on parle de gènes liés. Le calcul du taux de recombinaison génétique est d'une importance capitale pour les études de liaison génétique.

III.11.2 Analyse de liaison génétique.

Les valeurs des Z-Scores obtenus, à l'issu du test de recherche d'une liaison génétique entre les 10 marqueurs microsatellites de la région 5q31-33 et le niveau d'infection palustre ,ainsi que les distances génétiques séparant les différents marqueurs, sont rapportées dans le tableau 12.

Marqueurs microsatellites	Distance génétique (CM)	Z-Score
D5S642	0	1,168548
D5S2117	3	1,170174
D5S393	6,5	-1,165007
D5S399	6,5	-1,074553
D5S658	8,3	-1,801826
D5S436	12,9	1,141979
D5S2090	15,6	0,140084
D5S636	18,5	1,724298
D5S2012	21,7	0,274299
D5S487	23,3	0,450104

Tableau 12 : Données de l'analyse de liaison génétique.

CM : CentiMorgan

De ce tableau, il ressort que la distance génétique entre les marqueurs D5S642 et D5S2117 est de $(3-0) = 3$ CM, celle entre D5S393 et D5S2117 est de $(6,5-3) = 3,5$ CM etc. Ces calculs ont été effectués en isofréquence. La connaissance de la distance génétique entre deux marqueurs est indispensable pour déterminer le taux de recombinaison génétique. Plus les marqueurs génétiques seront proches du locus maladie, plus le taux de recombinaison est faible, et plus grande sera la vraisemblance de l'existence d'une liaison génétique. Le tracé du Z-Score = $f(\text{distance génétique})$, donne un pic caractéristique permettant de conclure à l'existence d'une liaison génétique entre le locus marqueur et le locus maladie (Figure 30).

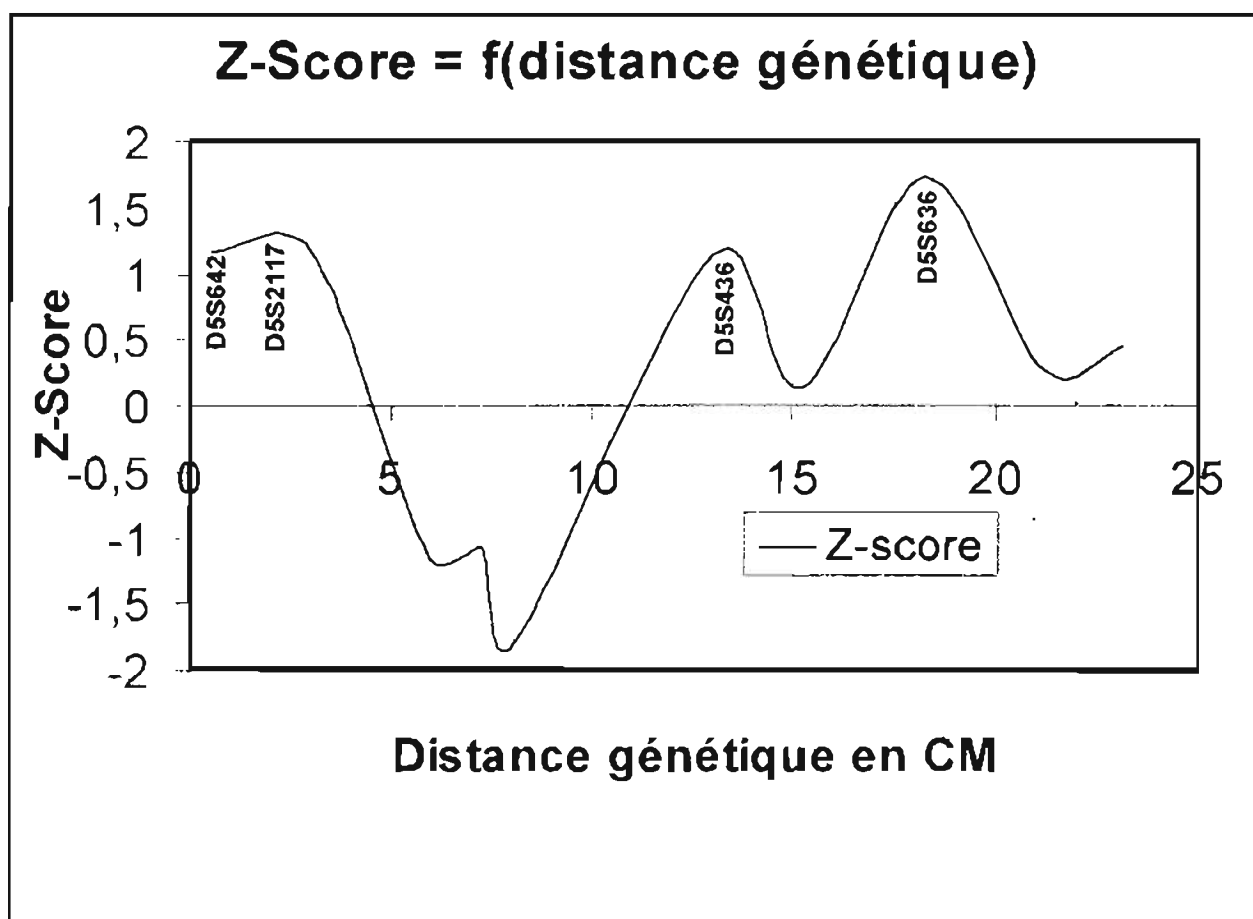


Figure 30 : Résultat de l'analyse de liaison génétique, par étude de la fréquence allélique observée dans la population étudiée.

Le marqueur D5S636, présente le pic le plus élevé (Z-Score = 1,724298). Viennent ensuite les marqueurs D5S2117 (Z-Score = 1,170174), D5S642 (Z-Score = 1,168548) et D5S436 (Z-Score = 1,141979). Par souci de clarté, nous avons présenté uniquement les quatre marqueurs génétiques ayant des Z-Scores supérieurs à 1. De ces quatre marqueurs, seul D5S636 semble lié à la parasitémie. En prenant en compte les $\frac{1}{2}$ germains, l'on pourrait augmenter considérablement la puissance du test, et par voie de conséquence les Z-Scores des trois autres marqueurs pourront augmenter davantage.

DISCUSSION

L'objectif de cette approche génétique, est de localiser des facteurs génétiques de l'hôte pouvant contrôler la charge parasitaire sanguine au cours de l'infection palustre. La recherche des facteurs génétiques impliqués dans le contrôle d'une maladie multifactorielle comme le paludisme, ne peut bien évidemment s'effectuer qu'en prenant en compte l'influence des facteurs environnementaux sur les phénotypes étudiés. C'est pour cette raison que ce travail de génétique humaine prend appui sur une importante étude épidémiologique réalisée par notre équipe au Burkina Faso de 1993 à 1996.

L'analyse de ségrégation familiale des marqueurs microsatellites, met en évidence la compatibilité entre les génotypes des enfants et ceux de leurs parents. On note ainsi la présence de fortes corrélations familiales notamment entre germains ($p < 10^{-4}$) et un effet génétique important sur la distribution du phénotype. L'analyse de ségrégation est fortement en faveur de l'existence de facteurs génétiques contrôlant la charge parasitaire sanguine (Rihet & al., 1998).

L'analyse de liaison génétique a été faite suivant la méthode de Kruglyak & Lander, (1995) à l'aide du programme informatique MAPMAKERS/SIBS. De cette analyse, il ressort que le marqueur microsatellite D5S636 semble lié à la parasitémie ($P = 0,042$).

En effet, dans cette même région chromosomique (5q31-33), Rihet et ses collaborateurs, ont analysé le polymorphisme de ces dix marqueurs microsatellites dans une population urbaine de la ville de Bobo Dioulasso, au sud ouest du Burkina Faso, faiblement exposée au paludisme. De cette étude, une liaison génétique a été observée entre la charge parasitaire sanguine et deux marqueurs microsatellites D5S393 et D5S658 ($p < 0,004$), séparés de 1,8 CM. Un locus dénommé Pfil1 (*Plasmodium falciparum* infection levels 1) contenant un ou plusieurs gènes impliqués dans le contrôle du niveau

d'infection palustre a donc été mis en évidence. Les variations de cette région expliquerait 45% de la variance de la charge parasitaire sanguine (Traore & *al.*, 1999). Les analyses multipoints telles que développées par Lathrop et ses collaborateurs, ont confirmé cette liaison génétique ($p < 0,0007$). La transmission de cet effet génétique n'est cependant pas compatible avec l'existence d'un gène majeur, ce qui laisse supposer un contrôle polygénique de ce phénotype (Rihet & *al.*, 1998).

L'existence d'un gène majeur contrôlant le niveau d'infection palustre a été démontré par d'autres auteurs (Abel & *al.*, 1992). Cependant ces données n'ont pas été confirmées dans d'autres populations par les mêmes auteurs (Garcia & *al.*, 1998), ni dans les deux analyses de ségrégation que notre équipe a réalisé au Burkina Faso (Rihet & *al.*, 1998). Une différence majeure est toutefois à noter. Rihet et ses collaborateurs, ne retrouve pas une liaison génétique significative entre le niveau d'infection à *Plasmodium falciparum* et le marqueur microsatellite D5S636 ($p > 0,4$). Ce résultat n'est pas pour autant incompatible avec celui que nous avons obtenu dans la mesure où, les études de liaison génétique ne permettent pas une localisation fine des gènes recherchés. Les études ultérieures qui seront conduites dans les deux populations (urbaine et rurale), d'association allélique, mettant à profit le test de la Transmission / Déséquilibre de liaison ou TDT, permettront cette localisation fine des gènes (Spielman, 1993). Il a été également montré que le marqueur microsatellite D5S636 est lié au niveau d'infection à *Schistosoma mansoni*, qui est aussi une autre parasitose. Les travaux réalisés par Marquet et ses collaborateurs (1996), puis par Müller et ses collaborateurs (1997), montrent une forte liaison génétique entre l'intensité de l'infection à *Schistosoma mansoni* et le marqueur D5S636 de la région 5q31-33 ($p < 0,005$).

L'analyse de liaison génétique a été faite suivant la méthode de Kruglyak et Lander, (1995). Le programme statistique utilisé est le MAPMAKERS SIBS. Cette analyse est partielle, car elle ne prend pas en compte les paires de $\frac{1}{2}$

germains. La prise en compte des paires de $\frac{1}{2}$ germains augmentera considérablement nos données (il y a en tous 180 paires de $\frac{1}{2}$ germains). Nous utiliserons une méthode statistique et un logiciel qui seront édités très prochainement (Commonges, Communication personnelle).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'étude pharmacologique que nous avons réalisée, a mis en évidence l'activité schizontocide d'extraits naturels de plante sur les souches de *Plasmodium falciparum* en culture *in vitro*.

Nous avons montré que les alcaloïdes et les tanins, selon leur provenance, ont présenté une forte variabilité de leur profil d'activité antiparasitaire ou hémolytique, et que Cette variabilité est d'une grande importance quant à l'orientation des tradithérapeutes pour une meilleure utilisation des plantes médicinales dans le traitement du paludisme.

C'est ainsi q' aux concentrations d'alcaloïdes testées, nous avons observé une excellente activité antiparasitaire et une absence de risque d'effets hémolytiques.

Aux concentrations des tanins testées, nous avons observé pour les tanins extraits des feuilles et des racines de *A. leiocarpus*, une bonne activité antiparasitaire et une activité hémolytique importante. Quant aux tanins extraits des feuilles et des racines de *M. inermis*, ils n'ont présenté aucune activité antiparasitaire, et renferment une activité hémolytique considérable.

Sur le plan génétique, nous avons analysé le polymorphisme de dix (10) marqueurs microsatellites du chromosome 5q31-33 dans une population rurale fortement exposée au paludisme à *Plasmodium falciparum*. Cette analyse familiale des marqueurs microsatellites, a permis de mettre en évidence la compatibilité entre les génotypes des enfants et ceux de leurs parents. La présence de fortes corrélations familiales notamment entre germains et un effet génétique important sur la distribution du phénotype ont également été observés. L'analyse de liaison génétique a montré que le marqueur microsatellite D5S636 contrôle la charge parasitaire sanguine au cours de l'infection palustre à *Plasmodium falciparum*.

Comme perspectives, nous comptons sur le plan pharmacologique, fractionner notre totum alcaloïdique, identifier les molécules actives et tenter d'élucider leur

mode d'action. Nous comptons aussi, évaluer l'effet potentialisateur de ces extraits vis-à-vis de la chloroquine et de plusieurs formes ioniques (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} etc.).

Par rapport à la génétique humaine, nous comptons étendre l'analyse du polymorphisme en utilisant un nombre élevé de marqueurs microsatellites assez proches du locus que nous avons localisé. Une fois le locus identifié, nous procéderons à une étude fonctionnelle de ce gène, c'est-à-dire que nous chercherons à savoir si le gène identifié contrôle effectivement le niveau d'infection palustre. Pour ce faire, l'on pourrait par exemple provoquer des mutations au niveau du gène et apprécier les variations phénotypiques (charge parasitaire sanguine). Le model animal (souris et primates) pourrait être utilisé pour la réalisation concrète de cette étude. Nous comptons enfin, étendre cette étude à d'autres populations exposées différemment au paludisme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mémoires, Thèses et Ouvrages

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Robert K. & Watson J.D. (1986). Biologie moléculaire de la cellule. Edition *Flammarion Médecine-Sciences*.

Ake-Assi L. & Guinko S.(1991). Plants used in traditional medicine in west Africa, édition *Roche Basel*, Switzerland.

Bach J.F. (1976). Immunologie. Edition *Flammarion Médecine-Sciences*.

Bruneton J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème} édition *Lavoisier Tech. et Doc.*

Coulibaly M. (1996). Contribution à l'étude in vitro de l'activité antiplasmodique d'extraits de huit (8) plantes médicinales du Burkina Faso. Thèse de Doctorat de Spécialité, Université de Ouagadougou.

Delauney J. (1988). Biochimie. Edition *Hermann*.

Feingold J., Fellous M. & Solignac M. (1998). Principes de génétique humaine. Edition *Hermann*.

Gentilini M., Danis M.& Mouchet (1991). Le paludisme, Universités francophones, édition *Marketing/Ellipses*.

Gros F., Grunberg-Manago M. (1974). Biosynthèse des acides nucléiques : réplication et transcription. Edition *Hermann*.

Institut National de la santé et de la recherche médicale (INSERM, France). (1996). Utilisation des marqueurs génétiques dans l'étude des maladies humaines. *Atelier de formation*.

Kaplan J.C. & Delpech M. (1995). Biologie moléculaire et médecine. 2^{ème} édition. *Flammarion Médecine-Sciences*.

Kumulungui B.S. (1997). Les bases naturelles et pharmacologiques de la résistance au *Plasmodium falciparum* : étude de l'activité antiplasmodique de quelques plantes utilisées en pharmacopée traditionnelle dans le traitement du paludisme au Burkina Faso. Mémoire de D.E.A, Université de Ouagadougou.

Lehninger A. L. (1985). Principe de Biochimie. Edition *Flammarion Medecine-Sciences*.

Millogo née Kone H. (1992). Contribution à l'étude chimique et microbiologique de *Holarrhena floribunda* : étude de l'activité antimicrobienne des alcaloïdes et leur évaluation toxico-pharmacologique. Thèse de Doctorat 3^{ème} cycle, Université de Ouagadougou.

Nkunya M.H.H. (1992). Progress in the search for antimalarials Published by *Napreca*, Addis Abeba University.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (1982). Manuel des techniques de base pour le laboratoire médical.

Perbal P. (1991). Clonage moléculaire, Edition *Vigot*.

Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W., Steitz J.A. & Weiner A.M. (1989). Biologie moléculaire du gène. *InterEditions* (quatrième édition).

ARTICLES ET REVUES SCIENTIFIQUES.

Abbas AK., Murphy KM & Sher A (1996). Functional diversity of helper lymphocytes. *Nature* **38**(3) : 787-793.

Abel L., Cot M., Mulder L., Carnevale P. & Feingold, J. (1992). Segregation analysis detects a major gene controlling blood infection levels in human malaria. *Am. J. Hum. Genet.* **50** : 1308-1317.

Asahi H. & Kanazawa T. (1994). Continuous cultivation of intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* in a serum-free medium with the use of a growth-promoting factor. *Parasitology*, **109**(4) : 397-401.

Astagneau P., Lepers J.P., Chougnat C., Gaudebout C., Andriamangotiana-rason D., Larouzé B. & Deloron P. (1991). Assessment of the protective value of antibodies to the Plasmodium falciparum Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen (RESA) : An epidemiologic study in Madagascar, *Am.Jour.Epidemiol.*, **133** (2) : 177-184.

Baird J.K. (1995). Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *P. falciparum* *Parasitology today*, **11** : 105-111.

Baird J.K. (1998). Age-dependent characteristics of protection susceptibility to *Plasmodium falciparum*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **92** (4) : 367-390.

Bonney G.E. (1984). On the statistical determination of major gene mechanisms in continuous human traits: regressive models. *Am.J.Hum.Genet.*, **18** : 731-749.

Bonney G.E. , Lathrop G.M., Lalouel J.M. (1988). Combined linkage and segregation analysis using regressive models. *Am.J.Hum.Genet.*, **43** : 29-37.

Bougnoux M.E. & Ancelle T. (1993). Place de l'artéméther parmi les dérivés du quinghaosu. *Cah. Santé*, **3**(4) : 308-313.

Bouharoun-Tayoun H., Oeuvray C., Lunel F.& Druilhe P. (1995). Mechanisms underlying the monocyte-mediated-antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* **182** : 409-418.

Bøyum A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, **21** : 77-89.

Braun-Breton C.(1993). Proteases in red blood cell invasion by malaria parasites. *Path.Biol.*,**41** (9) : 849-852.

Burkot T.R., Williams J.L. & Schneider L. (1984). Identification of *Plasmodium.falciparum* infected mosquitoes by a double antibody ELISA. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **33** : 783-788.

Butcher G.A. (1979). Factors affecting the in vitro culture of *P. falciparum* and *P. knowlesi*. *Bull. WHO*, **57** : 18-26.

Butler D., Maurice J.& O'Brien C. (1997) Time to put malaria control on global agenda. *Nature* **386** : 535-536.

Caira M.R.& Rasoanaivo P. (1995). Structure of malagashanine, a new alkaloid with chloroquine-potentiating action. *Journal of Chemical Crystallography*, **25**(11) : 725-729.

Carme B.(1991). Prévention et traitement du paludisme des expatriés en Afrique noire : influence de la chimio-résistance. Enquêtes menées à Brazzaville (Congo). *La Presse Médicale*, **20** : 1113-1116

Carnevale P, Bosseno M.F., Lallemand M., Feingold J., Lissouba P., Molinier M., & Mouchet J. (1981). Le paludisme à *Plasmodium.falciparum* et le gène de la drépanocytose en République populaire du Congo : Relation entre la parasitémie et le trait drépanocytaire à Djoumouna (région de Brazzaville). *Ann. Genet.*, **24**:100-104.

Chandra T., Krishnamurthy V., Madhavakrishna W. & Nayudamma y. (1973). Astringency in fruits : microbial degradation of wood apple tannin. *Leather Sci.*, **20** : 269-273.

Chandrasekharappa S.C., Rebelsky M.S., Firak T.A., Le Beau M.M. & Westbrook C.A. (1990). A long-range restriction map of the interleukin-4 and interleukin-5 linkage group on chromosome 5. *Genomics* **6** : 94-99..

Chevrier R. & Chopineau J.(1992). Vaccination antipaludique : état actuel et perspectives. *Lyon pharmaceutique*, **43**(4-5) : 201-209.

Chi-Tang H., Lee Chang Chang Y. & Mou-Tuan Huan G. (1992). Phenolic compounds in food and their effects on health : analysis, occurrence, and chemistry. *American Chemical Society Division of Agriculture and food Chemistry*, **506** : 337-338.

Cot M., Abel L., Roisin A., Barro D., Yada A., Carnevale P.& Feingold J (1993). Risk factors of malaria infection during pregnancy in Burkina Faso: suggestion of a genetic influence. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **48** : 358-364.

Crampton J.M., Galler R., Sinden R.E., Crisanti A.(1993). La plasmodie et les globules rouges. *La recherche*, **24** (259) : 1220-1296.

Davis W.C., Wyatt C.R., Hamilton M.J. & Goff W.L. (1992). A rapid, reliable method of evaluating growth and viability of intraerythrocytic protozoan hemoparasites using fluorescence flow cytometry. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, **87** : 235-239.

De Kossodo, S. & Grau, G.E.(1993). Profiles of cytokine production in relation of susceptibility to cerebral malaria. *J.Immunol.* **151**, 4811-4820.

Demerais F.M.& Bonney G.E. (1989). Equivalence of the mixed and regressive models for genetic analysis. *Genet. Epidemiol.*, **6** : 597-561.

Demerais F., Martinez M.& Lathrop M. (1996). Méthodes statistiques pour identifier les gènes dans les maladies multifactorielles. *Annales de l'institut pasteur*, **7**(1) : 3-12.

Deschamps A.M. (1985).

Evaluation de la dégradation de deux types de tanins condensés par les bactéries isolées d'écorces en décomposition. *Can.J.Microbiol.*, **31** : 499-502.

Dib C., Fauré S., Fizames C., Samson D., Drouot N., Vignal A., Millasseau P., Marc S., Hazan J., Seboun E., Lathrop M., Gyapay G., Morissette J. & Weissenbach J. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. *Nature*, **380** : 152-154.

Ferrante A., Kumaratilake L., Rzepczyk C.M. & Dayer J.M. (1990). Killing of *Plasmodium falciparum* by cytokine activated effector cells (neutrophils and macrophages). *Immunology Letters*, **25** : 179-188.

Field J.A., Kortekaas & Lettinga G. (1989). The tannin theory of methanogenic toxicity. *Biological Wastes*, **29** : 241-262.

Foote S.J., Burt R.A., Baldwin T.M., Presente A., Roberts A.W., Laural Y.L., Lew A.M. & Marshall V.M. (1997). Mouse loci for malaria-induced mortality and the control of parasitaemia. *Nature Genetics*, **17** : 380-381.

Fortin A., Belouchi A., Tam M.F., Cardon L., Skamene E., Stevenson M.M. & Gros P. (1997). Genetic control of blood parasitemia in mouse malaria maps to chromosome 8. *Nature Genetics*, **17**:382-383.

Garcia A., Cot M., Chippaux J.P., Ranques S., Feingold J., Demenais F., Abel L. (1998). Genetic control of blood infection levels in human malaria : evidence for a complex genetic model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **58** : 480-488 .

Garret C.E., Coderre J.A., Meek T.D. & al. (1984). A bifunctional thymidylate-synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **11** : 257-265.

Gazin P., Robert V., & Carnevale P. (1987). Le paludisme urbain à Bobo Dioulasso. 2 : les indices parasitologiques. Cah. ORSTOM, *Ser.Ent.Med.Parasitol.*, **1** : 27-31.

Gazin P., Robert V., Cot M., & Carnevale P. (1988). *Plasmodium falciparum* incidence and patency in high seasonal transmission area of Burkina Faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **82** : 50-55.

Grand W.D., (1976). Microbial degradation of condensed tannins. *Science*, **193** : 1137-1139.

- Guiguemde T.R., Toe A.C.R., Sadeler B.C., Gbary A.R., Ouédraogo J.B. & Louboutin J.P.**(1992). Variation de la densité parasitaire de *Plasmodium falciparum* chez des porteurs asymptomatiques : conséquences dans les études de chimio-résistance du paludisme. *Med. Trop.*, **52**(3) : 313-315.
- Gupta S., Hill A.V.S., Kwiatkowi D., Greenwood B.M., & Day K.P.** (1994) Parasite virulence and disease pattern in malaria. *Proc.Nat.Acad.Science.*,**91** : 3715-3719.
- Hardman N.** (1986). Structure and function of repetitive DNA in eukaryote. *Biochem. J.*, **234** : 1-11.
- Haseman J.K.& Elston R.C.** (1972). The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav. Genet.*, **2** : 3-19
- Hearne C.M., Ghosh S., Todd J.A.** (1992). Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.*, **8** : 288-294.
- Hill A.V.S., Allsopp C.E.M., Kwiatkowski D., Anstey N.M., Twumasi P., Rowe P.A., Bennett S., Brewster D., McMichael A.J. & Greenwood B.M.** (1991). Common west african HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, **352**: 595-600.
- Hill A.V.S.** (1996). Genetic susceptibility to malaria and other infectious diseases : from the MHC to the whole genome. *Parasitology* **112** : S75-S84.
- Hoffman S.L., Crutcher J.M., Puri S.K., Ansari A.A., Villinger F., Franke E.D., Singh P.P., Finkelman F., Gatley M.K., Dutta G.P. & Sedegah M.** (1997). Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin-12. *Nature Medicine*, **3** : 80-83.
- Jensen J.B.& Trager w.** (1977). *Plasmodium falciparum* in culture : use of outdated erythrocytes and description of the candle jar method. *J. of Parasitology*, **63**(5) : 883-886.
- Jensen J.B.** (1979). Some aspects of serum requirements for continuous cultivation of *Plasmodium falciparum*. *Bull.WHO*, **57** : 27-31.

Jepson A.P., Banya W.A., Sisay-joof F., Hassan-King M., Bennett S., & Whittle H.C. (1995) : Genetic regulation of fever in *Plasmodium falciparum* malaria in gambian twin children. *J.Inf.Disease*, **172**: 316-319.

Jepson A., Banya W., Sisay-Joof F., Hassan-King M., Nunes C., Bennett S., & Whittle H. (1997). Quantification of the relative contribution of major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC genes to human immune responses to foreign antigens. *Infect.Immun.* **65**(3) : 872-876.

Kirby G.C. (1996). Medicinal plants and the control of protozoal disease with particular reference to malaria. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.*, **90** : 605-609.

Kruglyak L.& Lander E. (1995). Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am.J.Hum.Genet.*, **57**:439-454.

Kruglyak L., Daly M.J., Reeve-Daly M..P. & Lander E.(1996). Parametric and non-parametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am.J.Hum.Genet.*, **58** : 1347-1363.

Lander E.S.& Schork N.J. (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science*, **265**: 2037-2048

Lathrop G.M., Lalouel J.M., Julier C.& Ott J. (1984). Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81** : 3443-3446.

Le Bras J., Basco L.K., Gremer G. & Charmot G. (1992). Apport de la génétique moléculaire à la compréhension des chimio-résistances de *Plasmodium falciparum*. *Bull.Soc.Path.Ex.*, **85** : 146-149.

Lewis J.A. & Starkey R.L. (1969).
Decomposition of plant tannins by some soil microorganisms. *Soil Sci.*, **107** : 235-241.

Litt M. & Luty J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am.J.Hum.Genet.*, **44** : 397-401.

Makkar H.P.S., Dawra R.K. & Singh B.(1988). Determination of both tannin and protein in a tannin-protein complex. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **36**(3) : 523-525.

- Malmberg A., Rosen G., Schatz B.A. & Theander O.** (1980). Antifungal activity of phenolic compounds against *Phoma exigua* var. *Foveata* in potato tubers. *Swedish J. Agric. Res.*, **10** : 89-95.
- Marquet S., Abel L., Hillaire D., Dessein H., Kalil J., Feingold J., Weissenback J. & Dessein A.J.** (1996). Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Shistosoma mansoni* on chromosome 5q31-q33. *Nature Genetics*, **14** : 181-184.
- Marsh, D.G., Neely J.D., Breazeale D.R., Ghosh B., Freidhoff L.R., Ehrlich-Kautzky E., Schou C., Krishnaswamy G. & Beaty T.H.** (1994). Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum Immunoglobulin E concentrations. *Science*, **264** : 1152-1156.
- Mc Guire W., Hill A.V.S., Allsopp C.E.M., Greenwood B.M. & Kwiatkowski D.** (1994). Variation in the TNF α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*, **371** : 508-511.
- Mendis K.N. & Carter. R** (1995). Clinical disease and pathogenesis in malaria. *Parasitol. Today*, **11** : PTI 1-16.
- Meshnick S.R., Taylor T.E. & Kamchonwongpaisan.** (1996). Artemisinin and the antimalarial endoperoxides : from herbal remedy to targeted chemotherapy. *American Society for Microbiology*, 301-315.
- Meyers D.A., Postma D.S., Panhuysen C.I.M., Amelung P.J., Levitt R.C. & Bleeckers E.R.** (1994). Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* **23** : 464-470.
- Miller LH** (1994). Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in africans and african americans. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, **91** : 2415-2419.
- Miller L.H., Good M.F. & Milon G.** (1994). Malaria pathogenesis. *Science*, **264** : 1878-1883.
- Miller L.H.** (1996). Protective selective pressure. *Nature* **383**, 480-481.

Miller S., Dykes D. & Polesky H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, **16** : 1215.

Mullis K. & Faloona T.(1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. *Meth.Enzymol.*, **155** : 335-351.

Müller-Myhsok B., Stelma F.F., Guissé-Sow F., Muntau B., Thye T., Burchard G.D., Gryseels B.& Horstmann R.D. (1997). Further evidence suggesting the presence of a locus, on human chromosome 5q31-33, influencing the intensity of infection with *Schistosoma mansoni*. *Am J Hum Genet.* **61** : 452-454.

Nagel R.L., & Roth E.F. (1989). Malaria and red cell genetic defects. *Blood* **74** : 1213-1221.

Naotunne T., Karunaweera N.D., Giudice G., Kularatne M.U., Grau G.E., Carter R.& Mendis K.N. (1991). Cytokines kill malaria parasites during infection crisis : extracellular complementary factors are essential. *J. Exp. Med.* **173**, 523-529.

Nicolaidis N.C., Holroyd K.J., Ewart S.L., Eleff S.M., Kiser M.B., Dragwa C.R., Sullivan C.D., Grasso L., Zhang L., Messler C.J., Zhou T., khleeberger S.R., Buetow K.H. & Levitt R.C . (1997). Interleukin 9 : A candidate gene for asthma. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **94** : 13175-13180.

Patarroyo M.E., Amador R., Clavijo P., Moreno A., Guzman F., Romero P., Tascon R., Franco A., Murillo L.A., Ponton G. & Trujillo G. (1988). A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, **332** : 158-161.

Patarroyo M.E., Vinasco J., Amador R., Espejo F., Silva Y., Moreno A., Rojas M., Mora A.L., Salcedo M., Valero V., Goldberg A.K. & Kalil J. (1991). Genetic control of the immune response to a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum*. *Parasite Immunol.*, **13** : 509-516.

Pattanapanyasat K., Webster H.K., Udomsangpetch R., Wanachiwanawin W. & Yongvanitchit K. (1992). Flow cytometric two-color staining technique for simultaneous determination of human erythrocyte membrane antigen and intracellular malarial DNA. *Cytometry*, **13** : 182-187.

Payne D. & Wernsdorfer W.H. (1989). Development of a blood culture medium and a standard in vitro microtest for field-testing the response of *Plasmodium falciparum* to antifolate antimalarials. *Bull. World Health Organ.*, **67**(1) : 59-64.

Picot S., Peyron F., Deloron P., Boudin C., Chumpitazi B., Barbe G., Veuillez J.P., Donadille A. & Ambroise-Thomas P. (1993). Ring-infected erythrocytes surface antigen (Pf/155RESA) induces tumor necrosis factor-alpha production. *Clin. Exp. Immunol.*, **93**: 184-188.

Postma D.S., Bleeker E.R., Amelung P.J., Holroyd K.J., Xu J., Panhyusen C.I.M., Meyers D.A. & al (1995). Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness coinherited with a major gene for atopy. *N. Engl. J. Med.*, **333** : 894-900.

Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S. & Frappier F.(1996). Recent results on the pharmacodynamics of *Strychnos malgaches* alkaloids. *Santé*, **6**(4) : 249-253.

Rasoanaivo P., Ratsimamanga-Urverg S., Ramanitrahasimbola D., Rafatro H., Frappier F., & Rakoto-Ratsimamanga A. (1998). Criblage de plantes de Madagascar pour activité antiplasmodiale et effet potentialisateur de la chloroquine. *J. of Ethnopharm.* (in press, accepted in june 12th, 1998).

Ratsimamanga-Urverg S., Rasoanaivo P., Milijaona R., Rafatro H., Frappier F. & Rakoto-Ratsimamanga A.(1994). In vitro and in vivo chloroquine potentiating action of *Strychnos myrtoïdes* against chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii*. *Planta Med.*, **60**(1) : 13-16

Rihet P., Abel L., Traoré Y., Traoré-Leroux T., Aucan C. & Fumoux F. (1998a). Human malaria: segregation analysis of blood infection levels in a suburban area and a rural area in Burkina Faso. *Genet. Epidemiol.* **15**(5) : 435-450.

Rihet P., Traoré Y., Abel L., Aucan C., Traoré-Leroux T. & Fumoux F. (1998b). Human malaria : *Plasmodium falciparum* blood infection levels are linked to chromosome 5q31-33. *Am. J. Hum. Genet.* **63** : 498-505.

Rihet P., Traoré Y., Aucan C., Traoré-Leroux T., Kumulungui B.S., Traoré A.S., Abel L & Fumoux F. (1999). Genetic dissection of *Plasmodium falciparum* blood infection levels and other complex traits related to human malaria infection. *Parassitologia*, **41** : 83-87.

Ringwald P., Bickll J. & Basco L. (1996a). Randomised trial of pyronaridine versus chloroquine for acute uncomplicated *P. falciparum* malaria in africa. *Lancet*, **347**(8993) : 24-28.

Ringwald P., Bickll J. & Basco L. (1996b). In vitro activity of antimalarials against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* in yaoude, Cameroun. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **55** : 254-258.

Robert V., Gazin P., Ouédraogo V. & Carnevale P. (1986). Le paludisme urbain à Bobo Dioulasso (Burkina Faso). 1. Etude entomologique de la transmission. Cah. ORSTOM, *Ser.Ent.Med.Parasitol.*, **24** : 121-128.

Ruwende C., Khoo S.C., Snow R.W., Yates S.N.R., Kwiatkowski D., Gupta S., Warn P., Allsopp C.E.M., Gilbert S.C., Peschu N., Newbold C.I., Greenwood B.M., Marsh K. & Hill A.V.S. (1995). Natural selection of hemi and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* **376** : 246-249.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. & Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239** : 487-491.

Saltman D.L., Dolganov G.M., Warrington J.A., Wasmuth J.J. & Lovett M. (1993). A physical map of 15 loci on human chromosome 5q23-q33 by two-color fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* **16** : 726-732.

Scalbert A. (1991). Antimicrobial properties of tanins. *Phytochemistry*, **30**(12): 3875-3883.

Sjöberg K., Lepers J.P., Raharimalala L., Larsson A., Olerup O., Marbiah N.T., Troye-Blomberg M. & Perlmann P. (1992). Genetic regulation of human anti-malarial antibodies in twins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **89** : 2101-2104.

Snow R.W. & Marsh K. (1998). The epidemiology of clinical malaria among african children. *Bull.Inst.Pasteur*, **96** : 15-23.

Spielman R.S., McGinnis R.E. & Ewens W.J. (1993). Transmission test for linkage disequilibrium : the insulin gene region and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM). *Am.J.Hum.Genet.* **52** : 506-516.

Stevenson M.M., Lyanga J.J., & Skamene E (1982). Murine malaria: genetic control of resistance to *Plasmodium Chabaudi*. *Infect Immun.*, **38** : 80-88.

Trager W. (1982). Cultivation of malaria parasites. *Br.Med.Bull.*, **38** : 129-131.

Traoré Y., Rihet P., Traoré-Leroux T., Aucan C., Gazin P., Coosemans M., Smith A., Abel L., Tall F., Nacro B., Traoré A.S. & Fumoux F. (1999). Analyse des facteurs génétiques contrôlant l'infection palustre chez l'homme. *Cahiers Santé*, **9** : 53-59.

Trape J.F. (1985). Rapid evaluation of malaria parasite density and standardisation of the thick smear examination for epidemiological investigations. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, **79** : 181-184.

Trape J.F. (1987a). Malaria and urbanization in central Africa: the example of Brazzaville. Part IV. Parasitological and serological surveys in urban and surrounding areas. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.*, **81** (suppl 2) : 26-33.

Trape J.F., & Zoulani A. (1987b). Malaria and urbanization in central Africa: the example of Brazzaville. Part III. Relationships between urbanization and the intensity of malaria transmission. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.*, **81** (suppl 2): 19-25.

Troye-Blomberg M., Riley E.M., Kabilan L., Holmberg M., Perlmann H., Andersson U., Heusser C.H. & Perlmann P. (1990). Production by activated human T cells of interleukin-4 but not interferon- γ is associated with elevated levels of serum antibodies to the activating malaria antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87** : 5484-5488.

Troye-Blomberg M., Berzins K.& Perlmann P. (1994). T-cell control of immunity to asexual blood stages of the malaria parasite. *Crit.Rev.Immunol.*, **14**(2):131-155.

Valsaraj R., Pushpangadan P., Smith U.W., Adsersen A. & Nyman U. (1997). Antimicrobial screening of selected medicinal plants from india. *Journal of Ethnopharmacology*, **58** : 75-83.

Vignal A., Gyapay G., Hazan J., N'Guyen S., Dupraz C., Cheron N., Beeuwe N. & al (1993). A non-radioactive multiplex procedure for genotyping of microsatellite markers. In: Adolph, KW (ed) *Methods in molecular genetics 1: Gene and chromosome analysis. Academic press, San Diego*, 211-221.

Wyatt C.R., Goff W.& Davis W. C.(1991). A flow cytometric method for assessing viability of intraerythrocytic hemoparasites. *Journal of Immunological Methods*, **140** : 23-30.

Ye Z.G. & Van Dyke K. (1989a). Selective antimalarial activity of tetrandrine against chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **159**(1) : 242-248.

Ye Z.G., Van Dyke K. & Castranova V. (1989b). The potentiating action of tetrandrine in combination with chloroquine or quinghaosu against chloroquine sensitive and resistant *P. falciparum* malaria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **165** : 758-765.

ANNEXES

Annexe 1

Les produits suivants ont été fournis respectivement par :

Amersham : NaOH, tampon Gold, Kit ECL, agent bloquant, Hyperfilm, membrane de nylon.

Amresco : SSC 1X (composition, cf annexe 1.g).

Appligène : Taq polymérase, MgCl₂.

Biorad : Bromure d'éthidium.

Boehringer Mannheim : SDS, Protéinase K, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, acrylamide/bis-acrylamide.

Carlo Erba : Ethanol absolu.

Genset : oligonucléotides ou primers.

GibcoBRL : Kb DNA Ladder, Agarose.

Interchim : TBE 1X (Composition, cf annexe 1.f), Picogreen, DNA phage λ .

Merck : KHCO₃, xylène cyanol, Temed.

Prolabo : NH₄Cl, KCl, NaCl, sucrose.

Ral : Bleu de Bromophénol.

Serva : tris-HCl, Na₂EDTA, SDS.

Sigma : Sodium acétate, sigmacote, Ammonium persulfate, urée, formamide.

a) Préparation du réactif de Mayer :

QSP 100ml :

iodure de potassium 0,5g/ml ; chlorure mercurique 0,02g/ml.

b) Préparation du réactif de Dragendorff :

QSP 100ml :

nitrate basique de bismuth 0,85g, iodure de potassium 8g, et acide acétique 25%.

k) Composition du tampon Généthon.

COMPOSITION	CONCENTRATION INITIALE	CONCENTRATION FINALE	CONCENTRATION DANS LA PCR
Tris-HCl	2M	100 mM	10 mM
MgCl ₂ liquide	1M	15 mM	1,5 mM
KCl		0,5 M	50 mM
Triton X100	100 X	1%	0,10%

l) Préparation de la solution mère d'acrylamide/bis-acrylamide 6%.

75ml d'acrylamide 38% plus N,N'-méthylène-bis-acrylamide 2%, 250g d'urée et 50ml de TBE 10X.

m) Préparation du bleu de formamide Stock

10 ml de formamide désionisée, 2,5 ml de xylène cyanol et bleu de bromophénol.

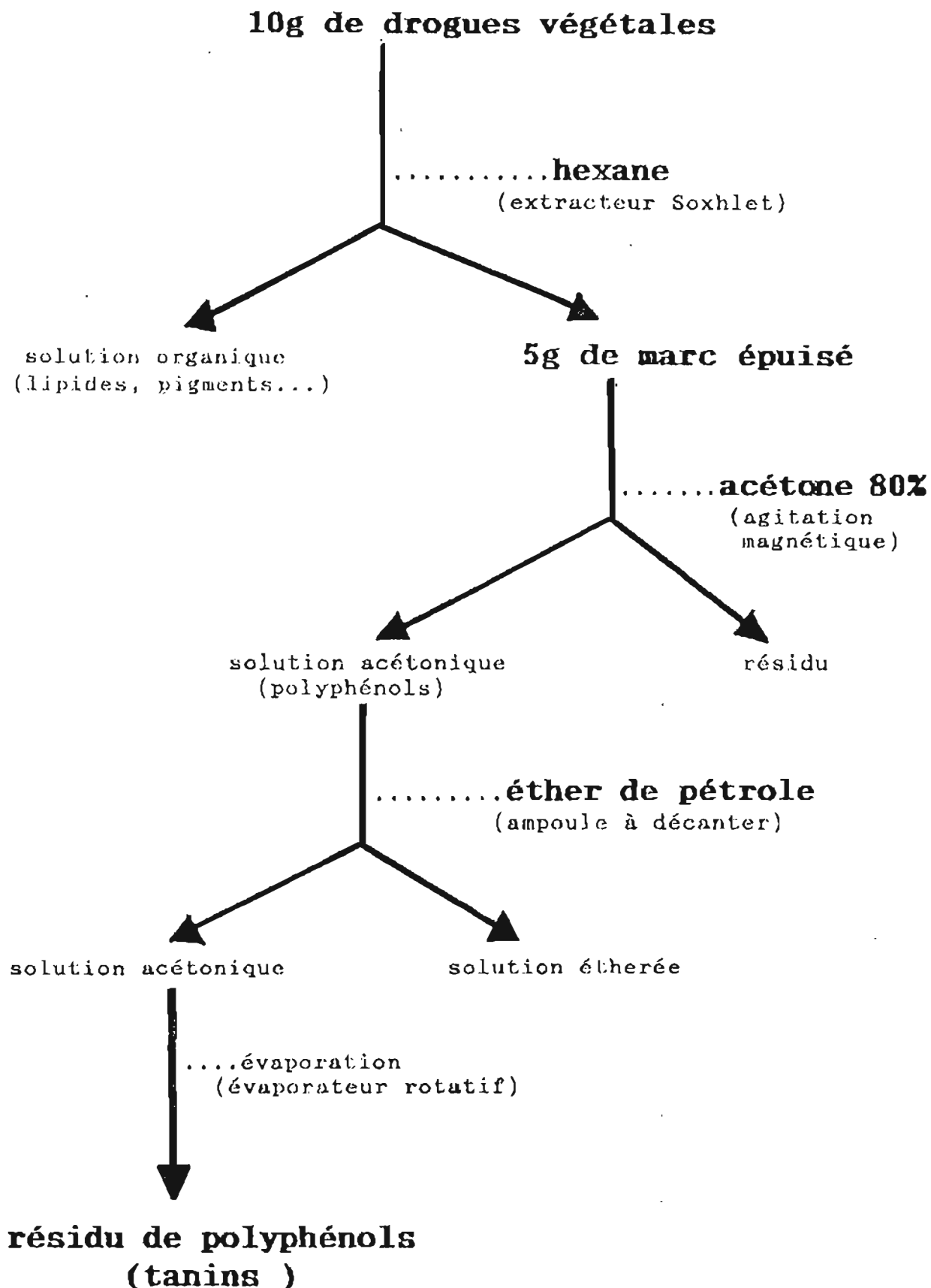
n) Préparation du Tampon d'hybridation.

250ml de tampon Gold, 12,5g d'agent bloquant 5% et 7,3g NaCl 0,5M

o) Préparation de la sonde polyAC.

Sonde poly AC 500 ng/μl, Péroxydase et glutaraldéhyde.

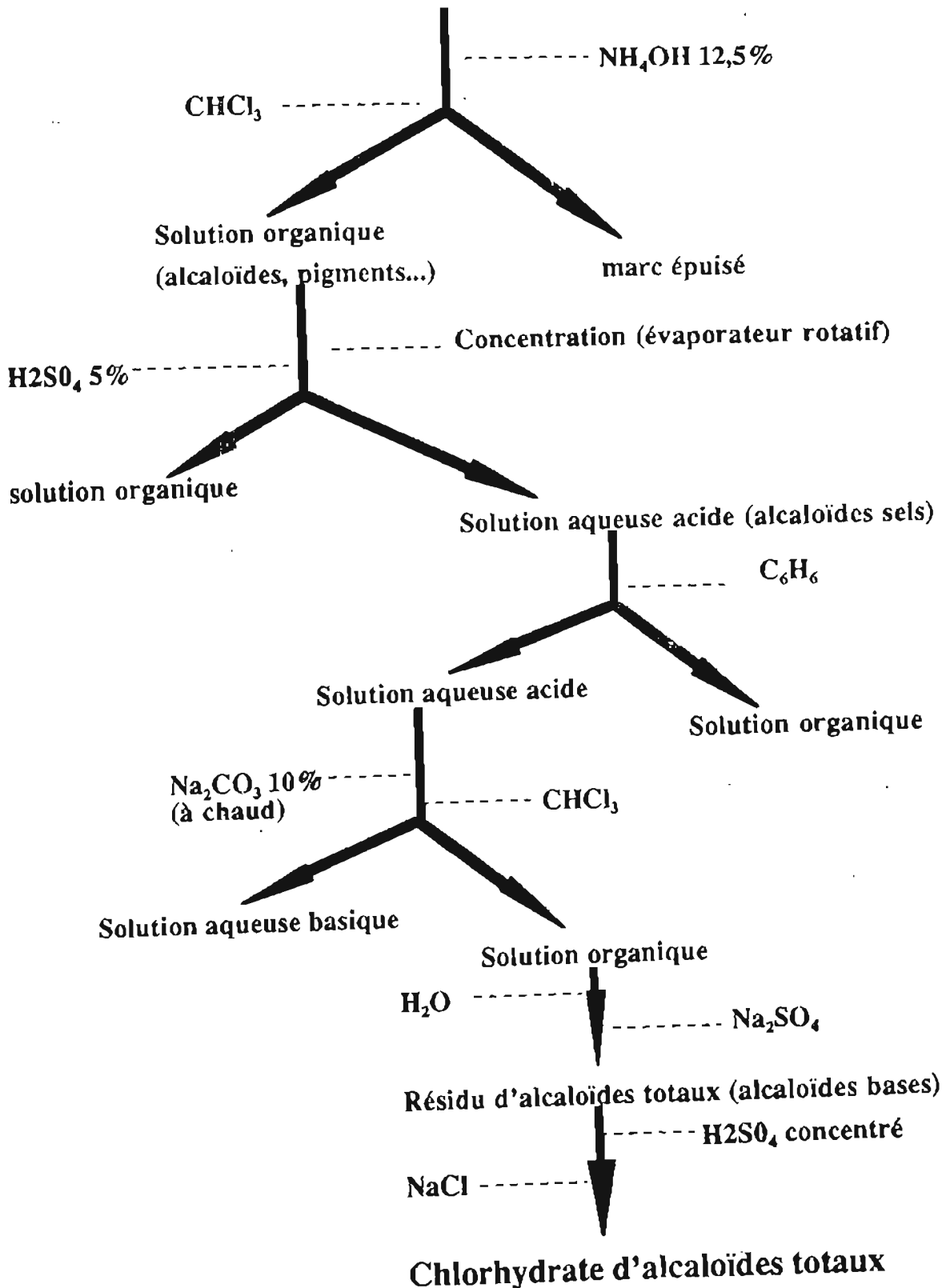
p) Le paludisme sévère ou severe malaria est une forme grave du paludisme dû à *P. falciparum*, caractérisée par une anémie souvent considérable (jusqu'à 1 millions d'hématies), une rate très volumineuse, une altération de l'état général avec apparition de fièvre bilieuse hémoglobinurique.



EXTRACTION DES ALCALOÏDES TOTAUX

Annexe 5

50 g de poudres végétales non délipidées



c) Préparation du BLB (Blood Lysis Buffer) 1X pH= 7,4

QSP 1L de solution 20X:

NH_4Cl : 155 mM ; KHCO_3 : 10mM ; EDTA: 1mM.

d) Préparation du WLB (White Lysis Buffer) 1X pH= 7,4

QSP 1L:

Tris-HCl: 10mM ; NaCl: 400mM ; Na_2EDTA : 2mM.

e) Préparation du TE (Tris-EDTA) 1X pH= 7,5

QSP 1L:

Tris-HCl: 10mM ; EDTA: 0,1mM.

f) Préparation TBE (Tris-Borate-EDTA) 1X pH = 8,3

Tris-Base : 0,089 M ; acide borique : 0,089 M ; EDTA : 0,002M.

g) Préparation du SSC (Sel Sodium Citrate)

Chlorure de sodium : 0,15M ; Citrate de sodium 0,015M.

h) Préparation du marqueur de taille (Kb DNA ladder stock)

DNA ladder (1Kb) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; H_2O ; Bleu de Bromophéno.

i) Préparation de la solution de Bleu de Bromophéno (BB).

60g de sucrose ; d'EDTA 0,5M, pH = 7,6 ; SDS 20% ; BB ; H_2O

j) Préparation de la solution de BB et de xylène-cyanol.

Xylène cyanol 0,25% ; BB 0,25% ; TBE 10X 0,1% ; Glycérol 30%.

FAM	IND	AGE	MDPA	DO260/DO280	Conc. (DO)	Concent fluo
50	502	27	-0,7796	2,11	200	216,686
50	503	26	-0,6763	2	200	205,549
50	504	7	0,5357	2,04	290	347,779
50	505	5	0,9755	1,95	98	90,380
50	506	25	-0,7324	2	75	61,946
50	507	13	-0,0044	1,89	180	184,376
50	509	5	0,9246	1,96	138	141,506
50	511	25	-0,746	2,06	88	71,721
50	512	7	-0,2016	2,04	378	433,382
50	513	5	0,3337	1,91	273	288,517
51	515	40	-0,5098	2	75	67,802
51	516	37	-0,4769	1,62	53	55,773
51	517	14	-0,4 47	1,94	175	207,508
51	518	12	-0,2132	1,95	185	175,138
51	519	10	1,3459	1,97	143	139,510
51	520	8	1,1804	1,94	248	282,518
52	521	38	-0,8141	1,94	258	252,402
52	522	28	-0,7496	1,88	118	108,815
52	523	6	0,455	1,93	203	261,978
52	524	4	1,5742	1,94	393	479,736
53	526	70	-0,6267	2	55	51,273
53	527	40	-0,9476	1,93	198	190,652
53	528	31	-0,7226	1,92	188	208,619
53	529	11	-0,1729	1,91	225	211,534
53	530	7	0,4125	1,94	155	139,628
53	531	4	0,7	2,04	285	317,957
53	533	29	-0,5879	1,94	238	286,487
53	534	6	0,5575	1,9	200	230,134
53	535	3	1,2509	1,9	143	118,932
53	537	29	-0,8276	1,97	173	179,177
53	1094	6	-0,2845	1,8	158	141,488
54	540	80	-0,8393	1,75	53	41,145
54	541	55	-0,9133	1,81	73	58,477
54	542	14	-0,6552	1,94	238	248,674
54	543	8	2,0006	1,89	298	328,225
54	544	12	-0,3741	2	150	130,233
54	545	54	-0,7844	1,97	193	192,498
54	547	11	-0,216	1,9	228	232,487
55	548	44	-0,8276	1,9	138	143,979
55	549	39	-0,79	1,95	180	190,535
55	550	20	-0,846	1,92	173	181,691
55	551	13	-0,238	1,94	263	315,225
55	552	11	-0,3004	1,91	305	239,328
55	553	4	-0,0945	1,9	533	555,375
55	555	42	-0,7727	1,91	205	189,617
55	557	12	-0,0874	2	135	135,037

FAM	IND	AGE	MDPA	DO260/DO280	Conc. (DO)	Concent(flou)
55	558	9	0,1687	1,95	375	467,266
55	559	7	0,2355	1,88	123	125,164
55	560	4	0,2453	1,95	293	335,423
55	562	25	-0,9034	1,9	95	95,008
55	563	6	0,3964	1,87	280	271,056
55	564	5	0,7047	1,94	160	143,733
56	566	69	-0,83	1,97	148	122,863
56	567	67	-0,7805	2	95	76,369
56	568	27	-0,5948	2,03	153	144,483
56	569	22	-0,1513	2,06	88	71,312
56	570	4	1,5941	1,88	225	266,500
56	1037	25	-0,5284	1,95	185	178,464
56	1038	5	1,1484	1,89	165	158,070
58	582	38	-0,8924	1,57	28	ND
58	584	3	0,2408	1,97	153	ND
59	589	56	-0,9931	1,97	178	148,420
59	590	40	-0,7947	1,97	158	121,272
59	591	15	-0,2346	1,91	153	135,633
59	592	12	0,147	1,96	270	261,709
59	593	10	0,7532	1,92	178	164,934
59	594	7	0,3827	1,98	273	250,324
59	595	4	1,3581	1,89	223	188,893
60	596	49	-0,812	1,91	225	235,555
60	600	12	0,4637	2,04	118	111,407
60	602	6	0,498	1,94	88	75,881
60	603	24	-0,7176	1,78	228	192,139
60	604	6	0,2797	1,91	215	218,312
60	605	4	0,2932	1,81	340	337,765
60	606	3	1,2664	1,89	180	194,588
60	607	24	-0,7048	1,9	48	50,284
60	608	6	-0,3253	1,95	205	230,824
62	610	44	-0,7594	1,9	348	331,625
62	611	40	-0,6508	1,92	120	112,315
62	614	5	0,8002	1,92	380	364,938
62	615	3	1,0509	1,97	493	427,100
62	616	38	-0,7598	2	70	ND
63	618	47	-0,7155	1,96	255	168,519
63	620	15	-0,4742	1,95	365	348,417
63	621	11	0,2619	1,97	325	370,029
63	622	9	0,7256	1,95	425	439,509
63	623	44	-0,7124	1,94	228	268,727
63	624	12	0,2164	1,85	93	95,530
63	625	8	0,3776	1,92	288	303,924
63	626	6	0,5761	1,95	298	353,253
64	628	40	-0,7323	1,94	248	225,144
64	629	31	-0,6591	1,97	183	174,458

FAM	IND	AGE	MDPA	DO260/DO280	Conc. (DO)	Concent(fluc)
64	630	10	1,0865	2	110	110,560
64	632	3	0,9207	1,96	220	238,121
64	633	11	-0,3244	1,94	248	213,205
64	1049	9	0,4985	2,06	263	330,358
65	634	40	-0,922	1,87	183	203,673
65	635	37	-0,8171	1,85	158	166,952
65	636	18	-0,3118	1,89	180	207,240
65	638	12	-0,2522	2	55	39,638
65	639	6	-0,009	1,89	330	474,931
65	640	4	0,2524	1,96	275	325,909
65	641	2	0,1074	2,23	408	466,813
65	1056	25	-0,4314	1,86	173	ND
65	1086	17	-0,7613	1,89	180	208,381
67	652	34	0,9721	1,97	158	ND
67	653	28	-0,3907	1,89	270	ND
67	654	4	1,8138	1,92	350	ND
69	664	31	-0,5948	1,89	223	ND
69	665	30	-0,796	1,85	190	ND
69	666	4	1,1533	1,98	248	ND
70	676	53	-0,8364	2,02	233	300,582
70	677	43	-0,6902	1,89	255	294,820
70	681	8	0,4025	1,93	218	237,691
70	682	4	1,0437	1,9	775	606,056
71	684	46	-0,6313	1,92	313	480,146
71	685	43	-0,7406	1,89	265	383,636
71	686	18	-0,4949	1,85	360	482,240
71	687	11	-0,2554	1,92	413	524,903
71	688	4	0,5059	1,95	365	456,865
72	690	39	-0,6704	1,71	90	91,304
72	691	35	-0,5539	1,8	270	370,847
72	692	12	1,0191	1,9	475	562,373
72	693	10	-0,1849	1,92	125	122,679
72	694	6	2,2264	1,96	338	434,528
72	695	4	1,4252	1,8	243	349,806
75	741	58	-0,7318	1,81	218	250,084
75	742	16	-0,3387	1,94	253	348,768
75	743	13	0,0735	1,9	280	409,285
75	744	23	-0,4355	2,04	133	150,431
75	745	5	1,244	1,89	250	361,157
76	747	45	-0,6685	1,89	175	218,383
76	748	42	-0,8119	1,78	143	151,211
76	749	18	-0,4315	1,9	243	345,581
76	751	9	-0,3489	1,91	263	319,499
76	752	8	-0,5926	1,8	90	92,712
76	753	6	1,6009	1,84	263	406,770
78	768	43	-0,9693	1,77	230	331,885

FAM	IND	AGE	MDPA	DO260/DO280	Conc. (DO)	Concent(fluo)
78	769	31	-0,8724	2	80	ND
78	1050	14	-0,7077	1,84	263	374,829
78	1051	8	-0,4633	1,83	288	399,215
78	1301	30	-0,6281	1,75	250	356,786
79	774	47	-0,7925	1,82	295	394,161
79	775	42	-0,8841	1,85	245	ND
79	778	14	-0,5468	1,89	553	ND
79	779	11	-0,3575	1,9	300	348,862
79	780	7	0,6686	1,87	253	313,389
80	782	33	-1,0099	2	155	179,296
80	783	27	-0,613	1,95	215	258,872
80	784	14	-0,497	1,86	260	287,893
80	785	11	0,5106	1,88	198	212,860
80	786	6	0,8736	2	240	274,474
81	789	38	-0,7911	1,91	330	464,804
81	790	30	-0,7797	2	190	224,765
81	791	14	-0,5854	1,95	360	422,918
81	792	11	-0,3746	1,89	265	281,513
81	793	9	0,2196	1,94	155	155,866
81	794	7	-0,2319	1,92	528	794,241
81	807	40	-0,9035	1,9	228	241,406
81	808	28	-0,7631	1,29	133	68,298
81	809	6	-0,1845	1,93	213	240,817
81	810	3	0,0888	1,88	80	80,303
83	801	51	-0,9021	2	100	ND
83	802	28	-0,9171	1,93	265	ND
83	804	25	-0,7408	1,9	190	ND
83	1046	6	0,3597	1,86	270	ND
86	822	26	-0,8662	1,95	210	ND
87	825	56	-0,7097	1,89	165	166,361
87	827	16	0,171	1,95	103	100,169
87	828	12	-0,4355	1,86	265	277,419
89	833	32	-0,8402	1,59	183	ND
89	836	5	1,3137	1,81	73	ND
90	838	38	-1,0038	1,97	143	ND
90	839	32	-0,813	1,92	178	ND
90	840	7	-0,672	1,81	118	ND
91	843	57	-0,7898	1,89	208	206,308
91	844	48	-0,7522	1,94	258	259,278
91	845	14	-0,373	1,97	315	321,978
91	846	11	-0,4862	1,89	270	295,626
91	847	20	-0,495	1,85	185	200,687
91	849	37	-0,9705	1,89	270	267,601
91	850	13	-0,6033	1,91	368	391,696
91	851	5	1,2487	1,91	110	108,768
91	852	39	-0,3954	1,91	105	97,990

FAM	IND	AGE	MDPA	DO260/DO280	Conc. (DO)	Concent(flou)
91	1043	5	1,0201	1,84	258	299,037
91	1047	7	0,3268	1,65	310	262,519
91	1068	18	9,9999	1,88	160	ND
92	863	51	-0,7066	1,95	190	206,281
92	864	46	-0,8147	1,96	128	139,733
92	865	11	0,0551	1,93	280	331,066
92	866	6	0,4946	1,91	273	283,627
93	867	49	-0,8198	1,86	238	232,891
93	869	10	0,2319	1,95	200	187,146
93	870	42	-0,9614	1,97	168	177,818
93	872	12	-0,3308	1,98	208	220,861
93	873	8	0,1798	1,9	285	303,718
94	875	38	-0,4729	1,88	278	327,743
94	876	31	-0,7476	1,93	270	323,059
94	877	14	-0,3825	1,89	330	364,115
94	878	8	-0,7121	1,89	165	170,643
94	879	4	0,6234	1,87	295	315,137
95	881	34	-0,6491	1,91	310	303,746
95	882	29	-0,8658	1,88	300	331,941
95	883	11	0,2455	1,8	90	108,730
95	884	7	-0,1826	1,82	50	47,093
95	887	26	-0,5957	1,92	448	635,057
95	889	7	0,5602	1,95	400	538,502
96	895	50	-0,778	1,92	188	193,627
96	896	28	-1,154	2	125	114,568
96	903	6	2,0925	1,96	348	397,081
96	905	25	-0,7889	1,94	243	249,274
96	906	6	0,3552	1,93	363	390,739
96	908	22	-0,5755	1,93	348	390,312
96	909	4	1,3029	1,86	205	204,746
97	912	45	-0,1881	1,89	298	324,317
97	913	41	-0,9044	1,86	270	298,064
97	915	16	-0,3062	1,82	333	356,760
97	917	6	0,5974	1,9	560	720,886
97	919	35	-0,9162	1,86	173	150,710
97	920	8	0,1591	1,91	205	193,150
98	924	26	-0,6478	1,91	378	373,957
98	925	11	-0,3372	1,87	430	457,177
98	926	7	0,6417	1,9	455	519,445
98	927	4	1,7627	1,88	305	356,232
98	929	9	-0,2821	1,9	243	263,566
99	930	40	-0,7167	1,91	220	240,823
99	931	38	-0,7661	1,95	185	191,738
99	933	9	-0,1241	1,92	345	359,601
99	934	6	-0,0645	1,92	408	393,723
99	935	45	-0,7775	1,92	245	386,158

FAM	IND	AGE	MDPA	DO260/DO280	Conc. (DO)	Concent(fluo)
99	936	9	-0,183	1,81	443	412,182
99	937	6	0,3296	1,86	308	399,6675
100	939	41	-0,8785	1,82	200	201,822
100	940	39	-0,8541	1,88	283	259,933
100	942	13	-0,6141	1,85	213	254,015
100	943	7	-0,3401	1,88	363	411,493
100	944	5	0,1122	1,93	513	513,844
100	946	13	-0,1907	1,84	148	120,409
100	947	11	-0,201	1,75	35	25,743
101	948	53	-0,877	1,77	293	468,105
101	949	52	-0,8122	1,7	85	91,943
101	950	27	-0,7459	1,77	190	195,922
101	952	7	-0,0231	1,89	260	390,299
101	953	4	1,6365	1,87	420	396,490
101	956	26	-0,6993	1,82	333	359,154
101	957	4	0,6564	1,87	388	389,809
101	959	6	0,6634	1,8	338	386,132
101	960	26	-0,4945	1,76	150	ND
101	1041	14	0,3501	1,8	288	315,561
101	1042	12	0,1502	1,87	420	403,666
102	962	44	-0,8207	1,84	313	347,555
102	963	39	-0,7187	1,8	90	69,504
102	964	13	-0,5131	1,83	330	376,605
102	965	11	-0,5657	1,8	243	336,3635
102	966	8	0,0618	1,71	103	100,563
102	967	2	0,7916	1,8	298	434,269
102	969	6	1,6083	1,71	145	138,355
103	979	49	-0,834	1,85	158	183,450
103	980	38	-0,6289	1,65	198	176,566
103	982	14	-0,7965	1,5	143	99,265
103	984	6	0,6976	1,85	190	203,113
103	985	3	0,2952	1,91	153	181,272
103	987	43	-0,7411	1,56	63	66,017
103	988	8	0,1146	1,64	58	48,478
104	989	43	-0,6636	1,77	173	205,963
104	990	31	-0,8284	1,83	270	315,919
104	991	14	-0,3742	1,76	150	144,887
104	993	6	-0,0385	1,82	78	74,524
104	995	3	0,4219	1,86	460	450,318
106	1006	38	-0,664	1,29	165	97,940
106	1007	32	-0,5732	2,18	240	248,493
106	1008	7	0,5182	1,81	168	195,449
106	1009	5	0,2549	2,1	153	143,307
106	1011	26	-0,7341	1,85	185	192,911
106	1012	6	0,2856	1,78	228	241,098
107	1072	34	-0,6706	1,85	158	164,113

FAM	IND	AGE	MDPA	DO260/DO280	Conc. (DO)	Concent(fluo)
107	1073	7	0,3419	1,88	150	165,175
107	1074	4	0,2365	1,82	233	295,255
107	1075	29	-0,7112	1,86	340	ND
107	1076	13	-0,2986	1,9	138	144,586
107	1077	8	-0,3528	1,89	223	265,206
107	1078	5	0,0854	1,7	378	524,095
107	1079	3	0,4288	1,87	603	ND
107	1081	36	-0,7884	1,77	235	261,181
109	1207	40	-0,7423	1,85	158	170,766
109	1208	34	-0,3556	1,81	118	113,423
109	1209	12	-0,846	1,52	175	86,876
109	1210	11	0,0854	1,76	295	300,910
109	1211	7	1,3612	1,57	55	46,484
110	1213	51	-0,7767	1,81	195	192,282
110	1214	55	-0,6766	1,64	103	93,073
110	1215	23	-0,3796	1,83	188	127,018
110	1216	18	0,0721	1,79	305	316,672
110	1218	14	0,0924	1,7	188	189,909
110	1219	6	-0,1869	1,82	295	294,257
110	1222	13	0,2633	1,84	198	193,488
110	1223	9	0,6061	1,95	200	216,776
110	1224	14	0,4017	1,67	138	140,572
110	1225	8	0,9754	2,13	358	310,218
110	1236	44	-0,608	1,82	200	227,230
110	1238	12	-0,515	1,77	208	235,468
110	1240	40	-0,7633	1,83	83	85,236
110	1242	16	-0,1616	1,8	203	252,470
111	1227	48	-0,5383	1,88	363	362,853
111	1229	16	-0,4198	1,76	150	157,874
111	1230	13	-0,0967	1,97	178	248,472
111	1233	18	-0,634	1,87	258	272,269
112	1246	35	-0,743	1,8	158	178,398
112	1248	26	0,0591	1,84	323	357,223
112	1249	18	-0,751	1,8	23	25,125
112	1251	32	-0,771	1,92	433	658,022
112	1252	14	0,1702	1,84	253	331,936
112	1253	11	-0,4338	1,89	355	418,565
112	1254	6	1,069	1,92	340	438,819
112	1255	3	0,2633	1,93	265	282,203
112	1256	30	-0,5971	1,85	190	179,419
112	1257	11	-0,0701	1,9	333	323,107
112	1258	6	1,0383	1,86	265	274,782
112	1259	7	-0,2102	1,9	418	380,584
112	1261	23	-0,625	1,67	318	265,736
112	1262	5	1,3151	1,87	738	676,165
112	1263	20	-0,734	1,94	170	ND

FAM	IND	AGE	MDPA	DO260/DO280	Conc. (DO)	Concent(fluo)
113	1266	46	-0,831	2,08	188	168,811
113	1267	44	-0,3985	1,94	228	386,546
113	1269	11	0,4099	1,77	248	339,728
113	1271	7	1,6721	1,9	395	368,771
113	1272	4	-0,0999	2	380	350,108
113	1273	45	-0,6035	1,86	270	244,461
113	1274	25	0,2881	1,95	190	302,669
113	1276	8	0,3849	1,94	175	227,483
113	1277	6	-0,7105	1,9	455	430,776
113	1278	3	0,5611	1,82	360	317,726
113	1279	24	-0,3717	1,9	243	ND
114	1288	3	0,237	2,07	140	140,846
114	1292	10	-0,3593	1,86	265	354,203
115	1295	17	0,3704	1,88	278	255,110
115	1296	14	-0,4272	1,8	158	154,389
115	1298	7	0,0567	1,82	233	246,445
115	1300	40	-0,8485	1,76	75	91,695