



AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE : Sciences de la vie et de la santé

## THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de DOCTORAT d'AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

Spécialité « Maladies infectieuses »

---

# Paludisme en zone d'hyperendémie : apport de la réponse cytokinique et transcriptomique

---

Présentée et publiquement soutenue le 13 Mai 2013 par

**M<sup>lle</sup> TRAVAILLÉ Christelle**

**Née le 11 Mai 1985 à Rennes**

### Membres du Jury de la Thèse :

Docteur Delphine ALDEBERT

Rapporteur

Docteur Antoine BERRY

Rapporteur

Professeur Daniel PARZY

Directeur de thèse

Professeur Francis FUMOUX

Directeur du jury



UMR-MD3 - IRBA Antenne Marseille (IMTSSA)  
GsBdD de Marseille Aubagne - 111 av. de la Corse - BP 40026  
13568 Marseille cedex 02



## Remerciements

*Au Docteur Delphine ALDEBERT et au Docteur Antoine BERRY*

*Je vous remercie de m'avoir accordé de votre temps pour évaluer et commenter le travail accompli au cours de cette thèse. Vos critiques pertinentes ont permis d'améliorer encore la rédaction de ce travail.*

*A monsieur le Général MORILLON et à monsieur le Général BOUGÈRE*

*Au premier pour m'avoir accueillie à mon arrivée et au second pour m'avoir autorisée à soutenir ma thèse au en ce lieu mythique qu'est le Pharo.*

*Au Professeur Daniel PARZY*

*Merci de m'avoir encadré durant ces 5 années de travail. Vous m'avez fait confiance sur ce projet ambitieux et vous avez su m'apporter les connaissances médicales qui me manquaient afin de mieux appréhender cette étude. Nos échanges m'ont permis d'enrichir mes connaissances et d'analyser différemment certains résultats. Cette aventure a été très enrichissante aussi bien sur le plan scientifique qu'humain. Mes voyages à Kinshasa ont été un vrai dépaysement, au cours desquels j'ai pu rencontrer des gens merveilleux.*

*Au Professeur Francis FUMOUX*

*Merci pour votre aide, vos conseils et d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.*

*Au Service de santé des Armées, pour m'avoir donné les moyens financiers de mener cette thèse à bien.*

*A Marylín MADAMET-TORRENTINO*

*Un grand merci pour ton aide et ses précieux conseils tout au long de ma thèse, aussi bien sur le plan technique que scientifique, même lors de ton congé maternité. Ta bonne humeur, tes fous rires et ton entrain m'ont souvent permis d'évacuer la pression. Ce fut un privilège de partager un bureau avec toi.*

*A Charles CHAPUS*

*Merci monsieur Statistique pour ton aide dans l'analyse de mes résultats, la relecture de mon manuscrit, ton aide dans ma présentation et ta patience lors de mes nombreux « Oups, j'ai oublié de te demander... »*

*A Véronique SINOÛ*

*Merci pour ton implication dans les corrections de ma revue et tes conseils dans la gestion de celle-ci. Tes conseils en vue de l'oral m'ont beaucoup aidé.*

*A Aurélie PASCUAL*

*Ce fut un plaisir de faire ta connaissance et de travailler avec toi. Tes conseils, nos fous rires, les pauses « café » et nos grandes discussions autour d'un ELISA ou d'un Luminox vont me manquer. Merci mon petit « Jiminy ».*

*A Camille DESGROUAS*

*J'ai été ravie de te connaître et de passer mes midis en ta compagnie miss Sudoku. Merci pour ton aide dans les manips de transcriptomique. Nous sommes devenues les reines des puces ensemble !!!*

*A Bruno PRADINES et Sébastien BRIOLANT*

*Merci pour vos discussions enrichissantes, vos conseils, votre confiance, votre disponibilité et votre bonne humeur.*

*A Nicolas TAUDON et Jérôme DESPLANS*

*Merci pour tous vos conseils et votre bonne humeur. Jérôme tu es le roi du système D.*

*A Christine LATOUR et Florent ROUVIER*

*Merci pour votre aide en cette fin de thèse où le timing est devenu très serré. Christine d'avoir été là dans les moments difficiles.*

*A Rémy AMALVICT*

*A mon petit Caliméro, merci d'avoir été là pour moi au cours de toutes ces années. J'ai toujours pu compter sur toi que ce soit dans le travail, dans les bons ou mauvais moments. J'espère que cela continuera encore longtemps.*

*A Nicolas BENOIT*

*Merci pour tes conseils en biologie moléculaire, ta bonne humeur et tes farces légendaires.*

*A Olivier MERLE*

*Derrière tes airs d'ours mal léché se cache un cœur en or. J'ai été ravie de faire ta connaissance et souhaite te garder dans nos vies pour longtemps.*

*A Frédérique, Stéphanie, Nathalie, Madjid, Eric, Serge, Pimpin, Lionel, Housseem, Maryse, Elisabeth et Dominique*

*Merci pour votre bonne humeur, votre soutien et votre écoute.*

*A toute l'équipe de Monkole :*

*A Léon Tshilolo pour son accueil au sein de l'hôpital et sa disponibilité.*

*A Guylain, Yves, Jean-Pierre, Mama Chantal et Christina pour leur implication dans ce projet et leur bonne humeur.*

*Aux Services administratifs*

*Merci pour votre aide et vos renseignements.*

*A ma famille et mes amis*

*Merci pour votre soutien et votre patience. Je vous remercie également de ne pas m'avoir tenu rigueur de mon indisponibilité de ces derniers mois.*

*A mes parents*

*Merci de m'avoir toujours encouragé et soutenu durant ces longues années dans mes choix professionnels et personnels. C'est votre foi en moi qui m'a fait arriver là où j'en suis aujourd'hui. Je vous aime très fort. A ma bonne étoile, qui veille sur moi.*

*A Julien, l'amour de ma vie*

*Ta rencontre fut la plus belle chose qui me soit arrivée au cours de ces dernières années. Tu as su m'apporter joie, amour, aide, soutien et réconfort. Ton écoute et tes conseils m'ont aidé à mener mon travail à bout dans les meilleures conditions possibles. A mon tour de prendre soin de toi maintenant.*

## Abréviations

AG : accès grave

AP : accès palustre associé à une atteinte pulmonaire

APA : l'atteinte pulmonaire aiguë

AS : accès simple

CDs : cellules dendritiques

CMH : complexes majeurs d'histocompatibilité

CSA : Chondroïtine Sulfate A

G/GM-CSF : facteur de croissance des granulocytes/granulocyte-macrophages

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN : interféron

IL- : interleukine-

MCP-1 : protéine chimioattractante des monocytes 1

MIP-1 $\beta$  : protéine inflammatoire des macrophages 1 beta

NK : natural killers (cellules tueuses)

NLR : NOD like receptor (récepteur de type NOD)

NO : oxyde nitrique

P : pneumopathie

*P. falciparum* : *Plasmodium falciparum*

PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule-1

*PfEMP-1* : *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

*PfGPI* : glycosylphosphatidyl-inositol de *P. falciparum*

*PfHRP2* : Hoseradish peroxidase II de *P. falciparum*

*PfTCTP* : homologue fonctionnel de l'HRF (Histamine Releasing Factor)

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs microbiens

SDRA : syndrome de détresse respiratoire aigu

TDR : test de diagnostic rapide

TLR : récepteur toll like

TNF : tumor necrosis factor (facteur de croissance tumorale)

VCAM : Vascular cell adhesion protein 1 (protéine d'adhésion cellulaire)

# Sommaire

<i>Remerciements</i> .....	2
<b>Abréviations</b> .....	5
<b>Sommaire</b> .....	6
<b>Préambule</b> .....	8
<b>Introduction</b> .....	11
1. Le paludisme à <i>Plasmodium falciparum</i> .....	11
1.1. Répartition du paludisme dans le monde .....	11
1.2. Le cycle de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	12
1.2.1 La phase sexuée (sporogonie).....	12
1.2.2 La phase hépatique (schizogonie pré-érythrocytaire).....	13
1.2.3 La phase intra-érythrocytaire (schizogonie érythrocytaire).....	13
1.3. Les signes cliniques du paludisme .....	13
2. Physiopathologie du paludisme grave .....	14
2.1. L'anémie sévère .....	14
2.2. Le neuropaludisme.....	15
2.3. La détresse respiratoire .....	16
2.4. Réponse inflammatoire exacerbée .....	44
<b>Objectifs</b> .....	47
<b>Epidémiologie</b> .....	49
<b>Résultats</b> .....	52
1. La modulation de la réponse cytokinique .....	52
1.1. Sujets et méthodes .....	54
1.2. Résultats .....	61
1.3. Discussion.....	68
2. Modulation de la réponse transcriptomique .....	77
2.1. Matériel et méthodes .....	79
2.2. Résultats .....	80

2.3. Discussion.....	84
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>93</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>101</b>
<b>Publications annexes.....</b>	<b>115</b>

## Préambule

Ayant effectué ma thèse au sein d'un institut de recherche du service de santé des armées, je souhaitais rappeler l'importance de l'étude des maladies infectieuses pour les forces.

Au cours de l'histoire, diverses épidémies ont scellé l'issue d'un combat. A l'époque des croisades, alors que Carthage vient d'être prise par les croisés, l'armée de Louis IX est décimée par la peste. Le roi en meurt, l'armée est défaite : ainsi sonne la fin des croisades.

En 1792, alors que les français et les contre-révolutionnaires se livrent une bataille sans merci, une épidémie de dysenterie bacillaire frappe les troupes prussiennes. Le combat vire en faveur des français, la bataille de Valmy est remportée et la survie de la République est assurée.

En 1895, une expédition militaire de 15 000 hommes est envoyée à Madagascar en vue d'une mise sous protectorat français de l'île. Mais l'expédition souffre terriblement de son manque de préparation. Les hommes manquent de quinine contre le paludisme. Alors que le corps n'a perdu que 25 hommes au combat, 5 756 meurent de maladie, soit un tiers du contingent envoyé, du jamais vu dans une entreprise militaire coloniale. Le dispositif reposait sur un recrutement important de main d'œuvre qu'il a été impossible de réunir. Le débarquement du matériel militaire et sanitaire à Majunga a été rendu pratiquement impossible dans les délais requis. C'est un véritable désastre.

Ainsi jusqu'à la première guerre mondiale, les maladies infectieuses tuent davantage de soldats que les combats. Depuis, avec l'amélioration de l'hygiène militaire, du suivi épidémiologique, de la prévention et des traitements médicaux, l'incidence des maladies diminue. Néanmoins dans les pays en voie de développement, où interviennent différentes armées occidentales, les maladies infectieuses représentent toujours une menace.

L'histoire des guerres montre que ces dernières occasionnent l'émergence ou la réémergence de nombreuses pathologies. Le déploiement de soldats dans des niches écologiques habituellement peu fréquentées, la destruction de la faune et de la flore et les mouvements de population sont autant de facteurs qui y contribuent.

Onze maladies dénommées « fléaux de guerre », ont été identifiées du fait de leur récurrence lors de conflits armés. Parmi elles, cinq sont des maladies à transmission vectorielle, c'est-à-dire qu'elles sont dues à un parasite véhiculé et inoculé par un vecteur vivant (rat, moustique, puce...) : la peste, la fièvre jaune, le typhus exanthématique, la fièvre récurrente à poux et le

paludisme. Aujourd'hui, la plupart des conflits dans lesquels les armées occidentales sont impliquées se produit outre-mer. Les maladies à transmission vectorielle sont donc pour l'armée toujours d'actualité.

# *Introduction*

# Introduction

## 1. Le paludisme à *Plasmodium falciparum*

L'agent responsable du paludisme est un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis à l'homme par des moustiques femelles du genre *Anopheles*. Cinq espèces de *Plasmodium* sont pathogènes pour l'homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Cependant, *P. falciparum* est l'espèce la plus virulente de par ses formes d'accès graves et ses résistances croissantes aux antipaludiques. Elle est également l'espèce la plus répandue dans les zones tropicales et subtropicales.

### 1.1. Répartition du paludisme dans le monde

Entre 2000 et 2010, une réduction de plus de 50% des cas de paludisme signalés a été constatée dans 43 des 99 pays touchés par la transmission (comme l'Algérie, le Cap Vert, la Namibie, le Rwanda, l'Afrique du Sud ou encore la Tanzanie), et 8 autres pays (comme l'Erythrée, l'Éthiopie, le Sénégal ou la Zambie) ont affiché une baisse de 25 à 50 %. Cependant, le paludisme demeure un problème de santé publique majeur. En 2010, environ 3,3 milliards d'individus, soit 47% de la population mondiale vit en zone d'endémie [1]. On estime à 219 millions le nombre d'épisodes palustres en 2010 dont environ 660 000 décès, principalement en Afrique, en Asie et en Amérique latine (Figure 1) [1]. L'Afrique (en particulier l'Afrique sub-saharienne) est le continent le plus touché avec 81% de cas, soit 174 millions d'individus. Les personnes les plus sévèrement touchées sont les femmes enceintes et surtout les enfants de moins de 5 ans, qui représentent 86% des décès recensés.



Figure 1. Répartition du paludisme dans le monde en 2010  
(source OMS : World Malaria report 2012)

## 1.2. Le cycle de *Plasmodium falciparum*

Le cycle de développement de *P. falciparum* est complexe et comprend deux phases, une phase exogène sexuée (la sporogonie) qui se déroule chez un arthropode hématophage (l'anophèle femelle) et une phase endogène asexuée (la schizogonie) comprenant elle-même deux stades de développement : un stade hépatocytaire et un stade érythrocytaire qui se déroulent chez un hôte vertébré intermédiaire (l'homme) (Figure 2).

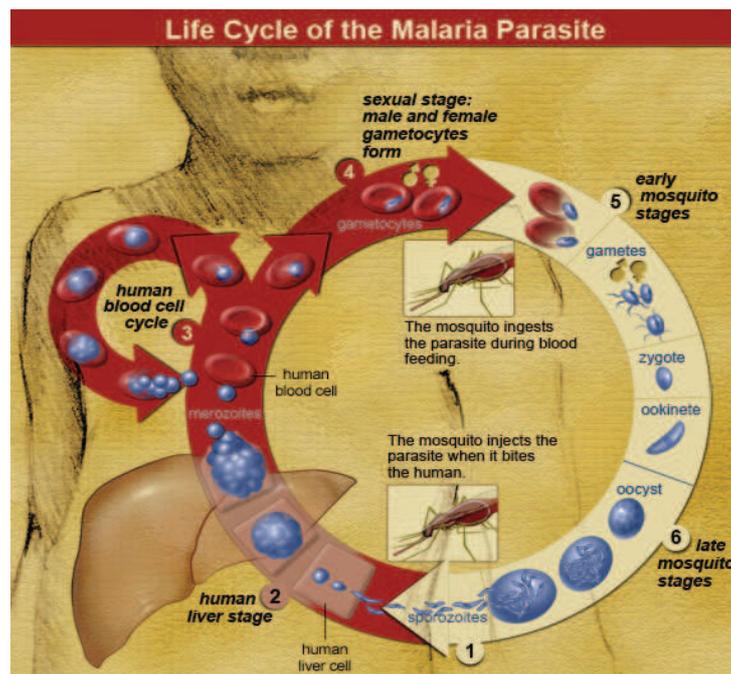


Figure 2. Cycle biologique de *Plasmodium falciparum* (source web : NIH, 2012). **La phase sexuée (sporogonie)**

Au cours d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes. Les gamétocytes mâles et femelles vont rapidement atteindre l'estomac pour initier le cycle sporogonique en se différenciant en cellules sexuées matures appelées « gamètes ». Ces gamètes mâles et femelles haploïdes vont pouvoir ensuite fusionner pour donner un zygote diploïde, « l'ookinète ». L'ookinète ainsi formé va traverser activement la paroi stomacale de l'anophèle et former à sa surface un oocyste. La croissance et la division d'un oocyste conduisent à la production de milliers de formes haploïdes actives, les « sporozoïtes ». Après cette phase sporogonique qui dure 8 à 15 jours, l'oocyste éclate pour libérer les sporozoïtes dans la cavité externe du moustique puis migrer vers les glandes salivaires de celui-ci et s'y accumuler. Au cours d'un nouveau repas sanguin, le moustique va injecter des dizaines de sporozoïtes dans la circulation sanguine de l'hôte.

### **1.2.2 La phase hépatique (schizogonie pré-érythrocytaire)**

Après leur injection dans la circulation sanguine de l'hôte, les sporozoïtes gagnent rapidement le foie pour envahir les hépatocytes. Ils se développent en schizontes qui engendreront par mitoses multiples plusieurs milliers de mérozoïtes dans une vacuole parasitophore. Cette phase, qui est asymptomatique sur le plan clinique, dure 7 à 15 jours. Les mérozoïtes qui se développent dans les hépatocytes sont contenus dans des vésicules appelées « mérosomes », qui vont leur permettre de quitter le foie sans risque de phagocytose. Les mérozoïtes qui sont ensuite libérés dans la circulation sanguine au niveau des capillaires pulmonaires envahissent les hématies et se multiplient au cours de la schizogonie érythrocytaire.

### **1.2.3 La phase intra-érythrocytaire (schizogonie érythrocytaire)**

Le cycle de développement parasitaire se réalise de façon périodique avec à la fin de chaque cycle le relargage de centaines de parasites capable d'envahir davantage d'hématies. C'est cette phase qui est responsable des symptômes de la maladie.

Les mérozoïtes relargués, par l'intermédiaire de multiples interactions récepteur-ligand, ont la capacité de reconnaître une hématie et de s'attacher à sa surface pour y être invaginés en moins de 60 secondes. Les mérozoïtes vont ensuite se différencier au niveau de la vacuole digestive en anneaux, en trophozoïtes puis en schizontes. Dans le cas de *P. falciparum*, le cycle érythrocytaire se répète toutes les 48 heures. Au cours de chaque cycle, chaque mérozoïte donne 8 à 32 mérozoïtes qui vont être libérés dans la circulation sanguine par rupture de la paroi érythrocytaire et infecter rapidement de nouvelles hématies. Au cours de leur développement dans les hématies, une petite proportion de parasites ne poursuit pas son cycle mais se différencie en forme sexuée pour entamer la « gamétocytogenèse » et donner des macrogamètes (femelles) et des microgamètes (males). Ces gamétocytes mâles et femelles sont des formes extracellulaires non pathogéniques responsables de la transmission de l'infection par le moustique, dans lequel ils continueront leur cycle sexué.

## **1.3. Les signes cliniques du paludisme**

Les manifestations cliniques du paludisme sont très diverses. Le paludisme débute généralement par un accès fébrile 8 à 30 jours après l'infection et peut s'accompagner de maux de tête, de douleurs musculaires, d'un affaiblissement général, de diarrhées modérées et de toux. L'accès palustre se traduit ensuite par des cycles typiques alternant épisode fébrile, tremblements accompagnés de sueurs froides et sueurs. La périodicité de ces cycles, qui va dépendre de l'espèce plasmodiale en cause, correspond à la phase intra-érythrocytaire au cours

de laquelle l'éclatement des hématies peut conduire à une anémie. Ces symptômes sont dépendants de plusieurs facteurs tels que le fond génétique de l'hôte, l'immunité acquise par celui-ci après de nombreuses années d'infection chronique, le rendant porteur asymptomatique mais également du degré de chimiorésistance et de virulence du parasite au cours de l'infection. Le paludisme à *P. falciparum* peut entraîner diverses complications qui vont engager un pronostic vital pour le patient. Les principales complications entraînant un accès palustre grave sont une anémie grave, un neuropaludisme et un syndrome de détresse respiratoire.

## 2. Physiopathologie du paludisme grave

Le spectre du schéma clinique de sévérité au cours d'une infection palustre est large, allant de l'accès fébrile peu compliqué aux formes graves de la maladie comme l'anémie sévère, le neuropaludisme ou encore l'atteinte pulmonaire aiguë (APA) pouvant évoluer en syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA). Alors que le neuropaludisme est la forme grave la plus étudiée lors d'une infection à *P. falciparum*, l'APA/SDRA sont des complications plus importantes lors d'un accès grave dû à *P. falciparum*, mais également lors d'un accès simple à *P. falciparum*, *P. vivax* ou *P. ovale*. Associé à une atteinte pulmonaire, le paludisme est responsable d'une forte mortalité et est plus communément observé chez des adultes que chez des enfants et des femmes enceintes, avec pour les individus non-immuns une plus grande propension à développer cette pathologie [2].

### 2.1. L'anémie sévère

L'anémie sévère est définie par un taux d'hémoglobine inférieur à 4 g/dl (norme : 11.0-16,5 g/dl) et un hématoците <13% (norme 44-46%), associé à une parasitémie >100 000 parasites/ $\mu$ l.

Il semblerait que les causes sous-jacentes de l'anémie sévère due à un accès palustre soient multifactorielles. Elles impliquent à la fois une diminution directe des hématies parasitées (éclatement érythrocytaire permettant la libération du parasite ou séquestration dans les organes) et indirecte des hématies saines (hématies endommagées), une érythropoïèse inefficace (réduction de production d'hématies au niveau de la moelle osseuse au cours de l'infection) et une dysérythropoïèse. L'augmentation de la destruction des hématies saines pourrait être due à une réduction du taux de protéines régulatrices du complément, qui protège les hématies d'une destruction anarchique et régule la cascade d'activation du complément [3, 4]. Le taux de réticulocytes particulièrement bas au cours d'un accès palustre semble dû à un dysfonctionnement soit au niveau du récepteur de l'érythropoïétine soit en aval de ce récepteur

[5]. Il existe une interaction entre les érythroblastes et les macrophages lors de la production des érythrocytes, faisant intervenir diverses cytokines dans la régulation de l'érythropoïèse [6]. Il semblerait que les cytokines et autres médiateurs de l'inflammation comme l'hémozoïne soient également impliqués dans ce phénomène d'anémie.

## 2.2. Le neuropaludisme

L'OMS définit le neuropaludisme comme étant un syndrome clinique caractérisé par un coma profond (impossibilité de localiser un stimulus douloureux) au moins 1 heure après la fin d'une convulsion ou la correction de l'hypoglycémie chez un patient infecté par *P. falciparum*, après exclusion d'autres causes d'encéphalopathie. Les mécanismes impliqués dans cette complication sont : la cytoadhérence, l'induction de cytokines pro-inflammatoires et de toxines parasitaires. La cytoadhérence est un phénomène qui peut se produire de trois façons différentes : par adhésion des hématies au niveau des cellules endothéliales [7], par adhésion des hématies parasitées au niveau des plaquettes [8-10] et via la séquestration des hématies parasitées au niveau de la microvascularisation du cerveau [11-13]. La séquestration des hématies parasitées, au niveau de l'endothélium, peut résulter d'une perte d'intégrité, compromettant la fonction de la barrière hémato-encéphalique soit directement [14-16], soit indirectement via les plaquettes [17, 18]. La production de microparticules à partir des cellules endothéliales activées par des hématies parasitées ayant adhéré peut également influencer sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique [17, 19]. Une augmentation du recrutement et de l'adhésion leucocytaire au niveau des sites inflammatoires est alors observée, propageant l'inflammation dans les tissus [20-24]. Ceci s'effectue par une amplification de la séquestration (obstruction de la circulation sanguine, accumulation d'acide lactique, hypoxie), de l'inflammation et une perte d'intégrité de la barrière endothéliale (augmentation de la perméabilité vasculaire, fuite de toxines parasitaires et infiltration leucocytaire). Les hématies parasitées ont la capacité d'adhérer aux cellules endothéliales grâce à l'interaction de récepteurs exprimés à leur surface comme PfEMP-1 (*P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) avec des récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales. Parmi les molécules impliquées dans l'adhésion parasitaire, on retrouve ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), VCAM (Vascular cell adhesion protein 1), la E-sélectine, la CSA (Chondroïtine Sulfate A) ou encore CD36 [18, 25, 26]. Une baisse de la résistance des cellules endothéliales est également observée lors de la cytoadhérence induite par les plaquettes [27]. Au cours de l'initiation par les hématies parasitées d'une réponse pro-inflammatoire et pro-adhésive dans les cellules endothéliales, il y a une répression concomitante des gènes impliqués dans la médiation de l'apoptose et une surexpression des gènes ayant un rôle dans la protection et l'intégrité de l'endothélium. Le glycosylphosphatidyl-inositol de

*P.falciparum* (PfGPI) et l'hémozoïne, relargués au cours de l'éclatement de l'hématie, sont reconnus par des récepteurs de la réponse humorale et activent la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ ) et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ex : l'oxyde nitrique ou NO) [28-32]. Ces médiateurs précoces de la réponse immunitaire participent à l'établissement d'une réponse antiparasitaire. Cette réponse doit être finement régulée car un déséquilibre du ratio pro/anti-inflammatoire peut entraîner des effets délétères sur l'hôte [33-36]. L'interaction et l'interdépendance de ces voies pathologiques [37] sont responsables de la formation d'œdèmes sous-capillaires et du dysfonctionnement d'organes tels que le cerveau et les poumons, conduisant au coma et à une détresse respiratoire.

### 2.3. La détresse respiratoire

REVUE

C. Travaillé<sup>1</sup>, M. Torrentino-Madamet<sup>1</sup>, S. Briolant<sup>2</sup>, V. Sinou<sup>3</sup>, C. Chapus<sup>1</sup>, A. AM. Nguyen<sup>1</sup>, D. Parzy<sup>1</sup>

#### **Inflammatory involvement in lung injury associated to malaria**

*The Open Journal of Microbiology 2012,*

#### **Résumé**

Aujourd'hui encore, le paludisme est un problème de santé majeur. Parmi les manifestations cliniques, les manifestations pulmonaires sont souvent sous-estimées alors que le paludisme semble être une source importante de SDRA, résultant d'un œdème organique. Le SDRA, trouvé aussi bien dans les accès palustres simples que sévères à *P. falciparum*, est également présent au cours d'une infection à *P. vivax* et *P. ovale*. L'augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire entraînant une fuite de liquide intravasculaire dans les poumons peut être observée à l'aide d'examen cliniques et semble être un mécanisme clé physiopathologique. Néanmoins, les mécanismes immunologiques pourraient être dus à un autre mécanisme clé, peu étudié jusqu'à présent.

Cette revue a pour objectif de faire un point sur les connaissances actuelles concernant la réponse inflammatoire périphérique au cours du paludisme et de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement du SDRA par la mise en corrélation avec la réponse inflammatoire impliquée dans deux maladies respiratoires obstructives bien connues, la maladie pulmonaire obstructive chronique et l'asthme. Par ailleurs, un tour d'horizon des outils actuellement disponibles pour la mesure des mécanismes immunologiques impliqués dans les voies aériennes est effectué. L'investigation de cette réponse inflammatoire pourrait aider à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents impliqués dans l'aggravation de la pathologie

du paludisme. Ceci pourrait également contribuer à la conception de nouvelles stratégies d'intervention rationnelles, en réduisant le nombre de lésions pulmonaires associées à au paludisme grâce à un diagnostic précoce, participant à l'évolution de la maladie.

Mots-clés : examens cliniques, perméabilité alvéolo-capillaire, *Plasmodium falciparum*, poumon, réponse inflammatoire, SDRA, séquestration.

## Inflammatory involvement in lung injury associated to malaria

C. Travaillé<sup>1</sup>, M. Torrentino-Madamet<sup>1</sup>, S. Briolant<sup>2</sup>, V. Sinou<sup>3</sup>, C. Chapus<sup>1</sup>, A. AM. Nguyen<sup>1</sup>, D. Parzy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR-MD3 (Aix-Marseille Université), IRBA, Antenne Marseille (IMTSSA, Le Pharo), BP 40026, 13568, Marseille Cedex 02, France

<sup>2</sup> Unité de Recherche en Biologie et Epidémiologie Parasitaires, Institut de Recherche Biomédicale des Armées - Antenne de Marseille, Marseille, France.

<sup>3</sup> UMR-MD3 (Aix-Marseille Université), Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385, Marseille cedex 5

### Corresponding authors :

Daniel Parzy, UMR-MD3 (Aix-Marseille Université), IRBA, Antenne Marseille (IMTSSA, Le Pharo), BP 40026, 13568, Marseille Cedex 02, France - E-mail: d.parzy@free.fr

Christelle Travaillé, UMR-MD3 (Aix-Marseille Université), IRBA, Antenne Marseille (IMTSSA, Le Pharo), BP 40026, 13568, Marseille Cedex 02, France - E-mail: christelletravail@hotmai.fr

### Abstract :

Among complications of the malaria access, the pulmonary injuries are the least well-known. However mortality rate can be as high as 80% in the absence of diagnosis and treatment in the *falciparum* malaria. Respiratory distress can also be present in *Plasmodium vivax*, *ovale* and *knowlesi* malaria. Lung damages can even appear several days after the beginning of the antimalarial drug treatment. These diverse considerations and the absence of simple and inexpensive methods of lung exploration explain the difficulties of physiopathological explanations for the origin of these dysfunctions. The key mechanism is not completely understood, but the noncardiogenic pulmonary oedema is probably the major cause of the pulmonary damages. The severe anaemia, metabolic acidosis or superinfection can also be implied. The role of the immunopathological mechanisms in relation to the physiopathological disorders are still poorly understood. The intervention of parasite sequestration is unclear, in part because pulmonary dysfunctions occur in infections with *Plasmodium vivax*.

This review has for objective to compile the current knowledge on the peripheral inflammatory response in malaria and to better understand mechanisms involved in the development of lung injury. The inflammatory response involved in chronic obstructive pulmonary disease and asthma is compared with the acute ARDS-associated malaria knowledge. In addition, a point of the currently available tools for immunological mechanisms measurement in airways is proposed. Understand the role of this inflammatory response could give more information on a subjacent phenomenon implicated in aggravation of the malaria pathology and contribute to the design of novel rational intervention strategies.

**Keywords:** Alveolar capillary permeability, ARDS, EBC, inflammatory response, lung, *Plasmodium falciparum*, sequestration.

---

## Inflammatory involvement in lung injury associated to malaria

I.	Introduction.....	20
II.	Malaria infection .....	21
A.	Clinical manifestations .....	21
B.	Peripheral inflammatory response.....	23
C.	Lung inflammatory response .....	26
1.	Immune cells involved in the maintenance of lung achievement.....	26
a)	Mast cells .....	26
b)	Macrophages.....	27
c)	Granulocytes.....	28
d)	Dendritic cells.....	28
e)	T cells.....	29
2.	Sequestration phenomena .....	30
D.	Animals model contribution in the comprehension of respiratory distress .....	31
III.	Lung injury exploration .....	32
E.	Pulmonary function tests or spirometry.....	32
F.	Bronchoalveolar lavage .....	33
G.	Sputum induction .....	33
H.	Exhaled breath condensate.....	34
IV.	Conclusion.....	35
V.	Abbreviations.....	36
VI.	References .....	37

## I. Introduction

Malaria remains a significant worldwide public health problem, especially in the tropical and subtropical areas. More than 3 billion individuals, 47 % of the world population, live in endemic countries [1]. Each year, malaria directly causes nearly one million deaths and about 200 million clinical cases, of which 2 to 3 million correspond to severe malaria (SM). In Western Europe, imported malaria represents 10,000 cases per year and 1,300 to 1,500 in the United States [2, 3]. Among the five species of *Plasmodium* (*P.*) parasites, *P. falciparum* is the most severe form of the disease, endemic in sub-Saharan Africa and throughout the tropics.

Among malarial clinical manifestations, the pulmonary manifestations are usually underestimated [4]. In malaria children, 14-40% present symptoms of respiratory distress such as acute respiratory distress syndrome (ARDS), with a mortality rate of 10 to 30% [5, 6]. In adults, there is no precise data regarding the prevalence of respiratory manifestations. In former publications the prevalence of these manifestations have been evaluated in 4-18% of uncomplicated *falciparum* malaria and in 20%–30% of patients with severe and complicated malaria, with a high mortality (80%) in absence of mechanical ventilation [5-13]. This misestimation is due to a lack of clinician information for lung assessment and limited exploratory mechanisms available in endemic area. The pathogenic mechanisms underlying the development of ARDS-associated malaria are still unclear. As in the case of ARDS due to others infections, the increase of the alveolar permeability is considered to be the key functional abnormality. Other mechanisms are probably involved in the development of respiratory distress such as sequestration or secondary bacterial infections [14, 15].

This review (methodology explains in an insert) does an update of the current knowledge on the peripheral inflammatory response, the major points of the mechanisms involved in the development of a lung achievement during malaria and the diagnostic tools. The numerous studies on the inflammatory mechanisms implied in two obstructive airway diseases, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma, will help us to better understand the ARDS-associated malaria pathophysiology.

Development of tools for early detection of this injury and a better understanding of inflammatory mechanisms in pulmonary alveoli during malaria seem to be essential.

For this literature review, we used the main search terms “malaria”, “*Plasmodium*” associated or not with the terms “lung/pulmonary damage/injury”, “acute lung injury or ALI/acute respiratory distress syndrome or ARDS” in the U.S National Library of Medicine (PUBMED). Animal and human studies were reviewed. We mainly selected publications in the past 10 years, but did not exclude commonly referenced and highly regarded older publications. We also searched the reference lists of articles identified by this search and selected those we judged relevant. Generally, preference was given to clinical articles, but review articles, letters, and editorials were included because they provided a comprehensive overview of histopathology or a historical view of the disease. The reference list was subsequently modified during the peer-review process on the basis of comments from reviewers and updated with newer publications. The search was performed with articles published up to February, 2013. The review was also completed by reading of immunobiology and respiratory physiology textbook chapters.

## II. Malaria infection

### A. Clinical manifestations

Clinical manifestations in malaria being well known, we will focus on a less studied specific aspect: the respiratory distress during malaria.

During clinical assessment, shortness of breath and cough are the main symptoms of malaria-induced pulmonary disease. These symptoms have to be supervised because dyspnoea and increased respiratory rate may start abruptly and progress rapidly over a few hours to cause life-threatening hypoxia.

Hypoxemia signs are detected by the apparition of cyanosis and decrease of blood oxygen level evaluated using a pulse oximeter (non-invasive method). This technic is sometimes inefficient due to reduced blood circulation to the fingers or earlobe. With these symptoms are associated recruitment of inspiratory extradiaphragmatic muscular groups (intercostal indrawing), expiratory muscular groups (activation of the abdominal muscles during the expiration) and the dilator of the higher air routes (nasal flaring). In severely hypoxic patients, signs such as confusion and agitation may be impossible to distinguish from cerebral involvement.

Respiratory distress can progress toward ARDS, which is the result of a lung organic oedema by alveolar epithelial or endothelial attack, in the absence of argument in favour of cardiac failure or fluid overload with inflammatory infiltrates. ARDS is composed of three levels of gravity defined as mild, moderate and severe ARDS that differ only in the degree of hypoxemia, based on  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  ratio (Table 1) [16].

Table 1. Defining criteria for acute respiratory distress syndrome (ARDS) (The Berlin definition).

ARDS category	Oxygenation	Chest x-ray
Mild	$200 \text{ mm Hg} \leq \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mm Hg}^a$ with PEEP or CPAP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$	Bilateral infiltrates <sup>b</sup>
Moderate	$100 \text{ mm Hg} \leq \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mm Hg}^a$ with PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$	
Severe	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mm Hg}^a$ with PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$	

a : Irrespective of the level of positive end-expiratory pressure.

b : Abnormal chest x-ray findings may lag behind functional disturbances.

**FiO<sub>2</sub>** = fraction of inspired oxygen; **PaO<sub>2</sub>** = partial pressure of oxygen in arterial blood; **PEEP** = positive end-expiratory pressure; **CPAP** = continuous positive airway pressure.

The chest x-ray may reveal bilateral frontal diffuse opacities (alveolar pattern). The increase of interstitial markings (mimicking observations in patients with ARDS due to other infections) followed by increasing areas of fluffy shadowing eventually may cover both lung fields. The cardiothoracic ratio is usually normal (excepting patient severely anaemic), and no signs of raised left atrial pressure are observed. These radiologic signs usually develop 6 to 24 hours after the onset of dyspnoea [17]. Less typical features include interstitial infiltrates alone, thickening of interlobular septal lines, and minor and major fissures. Pleural effusion is rare [18, 19]. Chest X-rays also may detect complications of ventilation (e.g., pneumothorax, pneumomediastinum) [20]. Nevertheless, certain lung abnormalities cannot be detected on a conventional chest X-ray image. The gold standard is the thoracic scanner with a better accuracy that could diagnose lung injury earlier, but it is too expensive to be used routinely.

Respiratory distress is considered as a severe malaria complication (Table 2) [4, 5]. Pregnant women with SM are particularly prone to developing ARDS, which is associated with high mortality [21]. In children, ARDS could be associated with the metabolic acidosis, usually involving lactic acidemia. This acidosis is a poor prognostic sign in children with SM or pneumonia [22, 23]. In metabolic acidosis, the chest is usually clear despite noisy laboured breathing whereas in pneumonia chest signs are usually abnormal.

Table 2. Severe manifestations of *P. falciparum* malaria in adults and children [4].

Prognostic value <sup>a</sup>		Clinical manifestation or laboratory investigation	Frequency <sup>a</sup>	
Children	Adults		Children	Adults
+	(?) <sup>b</sup>	Prostration/ extreme weakness	+++	+++
+++	++	Impaired consciousness	+++	+
+++	+++	Coma (unrousable coma defines cerebral malaria)	++	+
+	++	Multiple convulsions	+++	+
+++	+++	Circulatory collapse	+	+
+	+	Acute intravascular haemolysis with hemoglobinuria	+	+
+	+	Severe anaemia (In adults: haemoglobin <5 g/dL or haematocrit <15%)	+++	+
+++	++	Abnormal bleeding	+/-	+
++	+	Jaundice	+	+++
+++	+++	Respiratory distress (acidotic breathing = pH <7.35/plasma bicarbonate <15 mmol/L)	+++	+
+++	+++	Pulmonary oedema (radiologically defined)	+	+
+++	++	Acute renal failure	+	+++
+++	+++	Acidosis	+++	++
+++	+++	Shock	+/-	+
(?) <sup>b</sup>	(?) <sup>b</sup>	Hyperbilirubinemia (≥3 mg/dL)	(?) <sup>b</sup>	(?) <sup>b</sup>
+++	+++	Hypoglycaemia (<2.2 mmol/L)	+++	++
(?) <sup>b</sup>	+++	Hyperlactemia (plasma lactate >5 mmol/L)	(?) <sup>b</sup>	++
+/-	++	Parasitemia (≥4% to ≥20%, depends on malaria-acquired immunity, e.g. ≥4% in a non-immune individual)	++	+

<sup>a</sup>On a scale from + to +++ ; +/- indicates infrequent occurrence

<sup>b</sup>Data not available

Pulmonary oedema, *i.e.* fluid build-up in the lung alveoli, generally associated with severe disease, originates in the loss of the integrity of the alveolar-capillary barrier [24]. Nonhydrostatic/noncardiogenic pulmonary oedema is the most significant malaria-induced pulmonary manifestation and increased alveolar permeability is considered to be the key functional abnormality underlying ARDS-associated malaria [25]. Pulmonary oedema can precede other clinical signs (e.g., inspiratory crepitations) or radiologic signs.

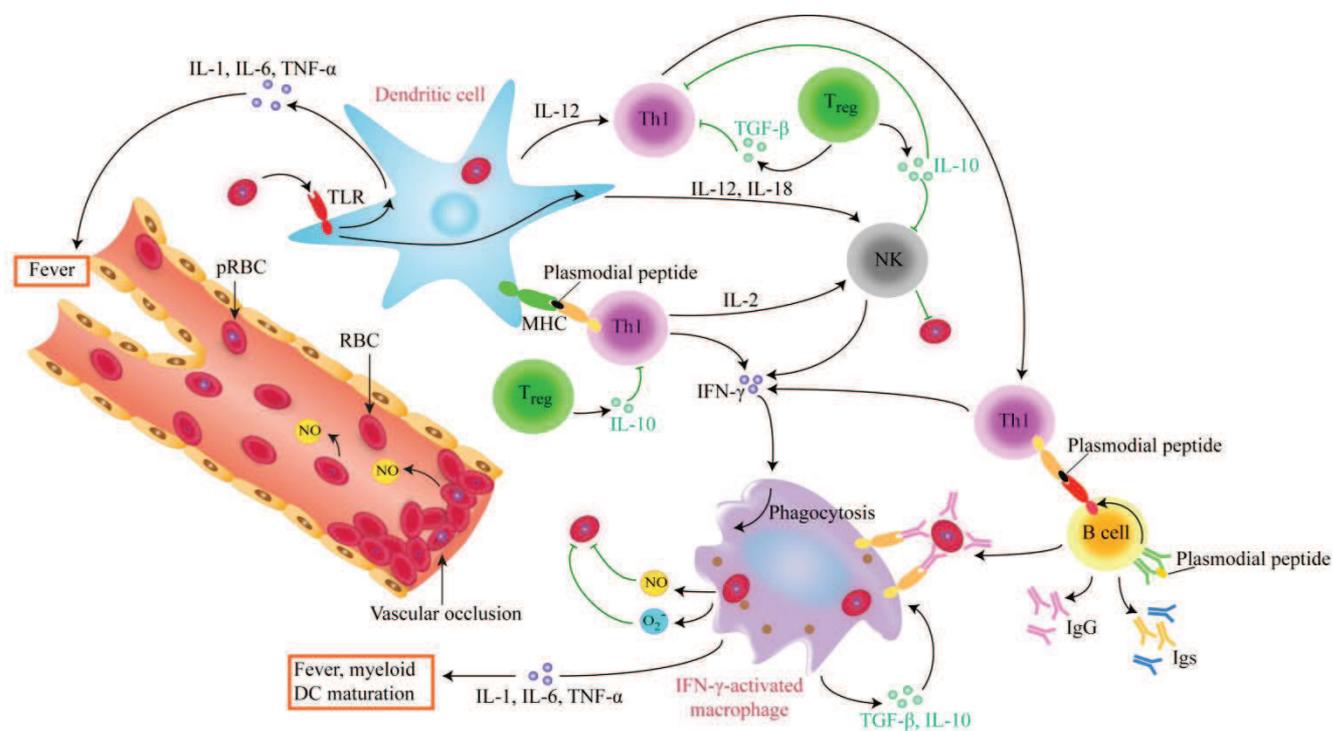
ARDS-associated malaria can be caused by heart failure parasite sequestration in the lungs, but only a low level of parasite is observed in the lung in *P. falciparum* [21, 22]. Moreover, alterations in pulmonary physiology have been described in *P. vivax*, *P. ovale* and *P. knowlesi* malaria with an airflow obstruction, impaired alveolar ventilation, reduced gas transfer and increased pulmonary phagocytic activity [26]. The pathophysiological mechanisms underlying the onset of this syndrome are still limited and misunderstood mechanisms may be responsible for ARDS in malaria. There is usually a poor response to diuretics, venodilators, and oxygen, in contrast to cardiogenic pulmonary oedema (fibrosis/pneumonitis) [7]. Nevertheless, recovery in survivors is rapid and pulmonary function returns to normal. So, clinicians should be aware that respiratory signs in malaria

might not always be caused by lung disease and tools easy to use have to be set up or developed to improve the outcome of patient presenting pulmonary involvement during malaria [5]. The presence of individual components should be specified for research purposes [11, 15].

### B. Peripheral inflammatory response

Despite a large number of studies, the knowledge of the key targets and mechanisms of protective immunity is surprisingly limited in malaria with many contradictory studies.

When a mosquito infected with *Plasmodium* bites a mammalian host, it injects saliva containing sporozoites into the skin. The sporozoites reach the circulatory system and are transported to the liver, where they infect hepatocytes. After several days of development inside hepatocytes, thousands of merozoites are released into the bloodstream, where they invade erythrocytes. This is the start of the symptomatic erythrocytic stage of the disease. At this stage, the innate and T cells pro-inflammatory responses are essential to the control of malaria infection (Fig. 1) [27, 28].



**Fig. (1).** Humoral and T-cell-mediated immune responses against malaria.

Parasites and pRBCs activate DCs through TLRs and are phagocytized. Their antigens are presented to T cells. TLR signaling leads to secretion of cytokines that initiate the inflammation that underlies malaria pathogenesis and direct Th1 cell differentiation. Th1 cells induce B cell proliferation and antibody secretion. Th1 cells secrete IFN- $\gamma$ , activating macrophages which phagocytize opsonized parasites and pRBCs and kill them through NO- and O<sub>2</sub>-dependent pathways. Inflammation is controlled by the secretion of anti-inflammatory cytokines from macrophages and regulatory populations of T cells.

**MHC** = Major Histocompatibility Complex; **NK** = natural killer cells; **NO** = nitric oxide; **pRBC** = parasitized Red Blood Cells; **RBC** = Red Blood Cells; **TCR** = T Cell Receptor; **TLR** = Toll-Like Receptor; **Treg** = Regulatory T Cells

In general, merozoites invade erythrocytes via receptors-ligands interactions. The *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP-1*) expressed by the parasite enables *P. falciparum*-parasitized red blood cells (pRBCs) to interact with hosts receptors such as CD36 or intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) present on the surface of many cells, inducing a parasite sequestration. In response to parasite antigens (*PfEMP-1*, *P. falciparum* glycosylphosphatidyl-inositol (*PfGPI*) and hemozoin) recognized by pattern-recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs) or inflammatory cytokines, such as interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), dendritic cells (DCs) and macrophages are activated. Both of them produce a variety of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1 (IL-1), IL-6, and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) while IL-12 and nitric oxide (NO) were produced by DCs and macrophages, respectively. Several authors have demonstrated that peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from donors never exposed to malaria can induce early production of TNF- $\alpha$ , IL-12, and IFN- $\gamma$  within 10 h after infection in response to the stimulation of parasites antigens [29-34]. It is postulated that IL-12 induced by mature DCs activates natural killer (NK) cells, both effectors of innate immunity, to produce IFN- $\gamma$ .

To determine the potential contribution of innate immune and/or adaptive responses to the early stage of inflammation to *P. falciparum* malaria, the kinetics and cellular sources of IFN- $\gamma$  production have been examined by Artavanis-Tsakonas et al. [35]. This team found that NK cells represent effectively an important early source of IFN- $\gamma$ , highly IL-12 dependent and partially IL-18 dependent. However, addition of exogenous IL-12 or IL-18 did not enhance the response of initially not responding donors. Moreover, increased NK cells toxicity has been reported during mild malaria infection, but appears to be depressed in children with severe disease and in pregnant women [36, 37]. The down-regulation of IFN- $\gamma$  and IL-12 production, observed with cells from donors living in an area of very high endemicity, may be a component of acquired clinical immunity in malaria. This mechanism remains to be elucidated [38]. Despite essential role of IL-12 in the activation of NK cells, the differences of NK cells reactivity and IFN- $\gamma$  responses between patients are misunderstood. They appear to be influenced by the genetics background of both host and parasite [39, 40]. Regarding to heterogeneous responses observed in early IFN- $\gamma$  production, it clearly seems that immune response involved is more complex and brings in more immunological effectors.

The role of TNF- $\alpha$  has been also extensively studied, highlighting a dual role with beneficial and harmful properties in host response to malaria [41]. Although early production of TNF- $\alpha$  may contribute to the protective immune response in control of malaria infection by inducing fever, which is damaging to parasite development, and/or by stimulating effector cells, its excessive production at a later stage leads to severe complications. These complications include severe organ damages, hyperparasitaemia, severe malarial anaemia and cerebral malaria (CM) [42-44]. Indeed, plasmatic TNF- $\alpha$  level is higher in SM suggesting an important role of this mediator in the pathogenesis of the disease [42, 44, 45]. The pro-inflammatory response must be tightly regulated, because an imbalance in the ratio of pro/anti-inflammatory response can cause deleterious effects to the host [46-49]. Indeed, more than TNF- $\alpha$  alone, the balance between TNF- $\alpha$  and IL-10 appears to be crucial in

the clinical course of SM [50, 51]. Production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 is essential to regulate the production of TNF- $\alpha$  and prevent harmful pathological consequences. The anti-inflammatory cytokines, IL-10 and tumor growth factor beta (TGF- $\beta$ ), are produced by activated macrophages or natural cells (also named natural T<sub>reg</sub> cells). These anti-inflammatory cytokines inhibit T helper 1 (Th1) cell proliferation. The Th1 signalling is induced by direct antigen-presenting of mature DCs to Th1 cells and by secretion of IL-12. In return, Th1 cells produce IL-2 that activates NK cells to produce IFN- $\gamma$  [52, 53]. T<sub>reg</sub> cells seem to play a critical role in balancing protective immune responses and immune-mediated pathology, modulating acute pro-inflammatory and/or Th1 memory responses to infection [54, 55].

Natural T<sub>reg</sub> cells exert a powerful immunosuppressive function after stimulation through the T cell receptor, process that appears to require antigen presenting cells [56, 57]. After their activation, natural T<sub>reg</sub> cells do not require further stimulation and are able to suppress T cell responses in a non-specific manner. It has been reported that T<sub>reg</sub> cells express TLRs and proliferate in response to lipopolysaccharide, raising the possibility that putative malarial TLR agonists, PfGPI or hemozoin-bound DNA might stimulate T<sub>reg</sub> function during infection [58-60]. Even if there is no evidence that these molecules can specifically stimulate proliferation upon binding to natural T<sub>reg</sub> cell-expressing TLRs, it has been shown that TLR9 engagement in DCs is required for natural T<sub>reg</sub> cell activation by malaria parasites [61]. In addition to natural T<sub>reg</sub> cells which develop in the thymus, induced T<sub>reg</sub> cells derived from conventional CD4<sup>+</sup> T cells constitute another subset of suppressor lymphocytes [57]. These last acquire suppressive activity upon activation and exposure to signals such as immunosuppressive cytokines or immature DCs. Importantly, a recent *in vitro* study using PBMCs from healthy donors stimulated with pRBCs has shown that the induction of T<sub>reg</sub> cells by malaria parasite did not necessarily require direct contact with antigen-presenting cells. This explains why malarial immunosuppression is not confined to malaria-specific immune responses. These observations provide new insights into the mechanisms governing T<sub>reg</sub> cells induction during malaria infection [62]. Indeed, in *P. falciparum*, it was shown a dose-dependent effect of pRBCs on DCs. While low doses of pRBCs initiate partial maturation of DCs, high doses result in inhibition of the ability of DCs to activate CD4<sup>+</sup> T cells [63]. Induced T<sub>reg</sub> cells, expressing high level of FOXP3 (on contrary to natural T<sub>reg</sub> that expressed intermediate levels of FOXP3) seem to suppress pro-inflammatory response to the parasite (including IL-12 production) associated to IL-10, TGF- $\beta$  and IL-2 induction [63, 64].

Investigating the role of T<sub>reg</sub> cells in *P. vivax* malaria, it was also observed an alteration of the myeloid DCs/plasmacytoid DCs ratio that potentially leads to T<sub>reg</sub> cells activation and IL-10 release, contributing to a general immunosuppression [65].

Whereas some studies suggest that T<sub>reg</sub> cells might modulate deleterious inflammation involved in disease induction, in other cases T<sub>reg</sub> cell-mediated inhibition of immune responses results in increased parasite density, determinant key of disease severity. When the expression of genes involved in immune responses was analysed in PBMCs from Fulani and Mossi individuals (sympatric populations of Burkina Faso differing in their genetic background and degree of susceptibility to malaria), an overexpression of Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-18, TBX21) as well as Th2-related genes (IL-4, IL-9, GATA3) and a reduced expression of genes distinctive of T regulatory activity (CTLA4 and FOXP3) were observed in the more resistant Fulani individuals [66]. These results suggest that the higher resistance to malaria of the Fulani could derive from a functional deficit of T<sub>reg</sub> cells.

The findings concerning the role of T<sub>reg</sub> cells in malaria appear consistent with their role in other infectious diseases. These cells maintain homeostasis by controlling the magnitude of immune responses, in particular the

need to limit the significant tissue damage being able to arise as a side-consequence of antimicrobial immune responses. Examples of the role of  $T_{reg}$  in reducing immunopathology can be found in the original observation of their role in reduction of pulmonary inflammation in pneumocystis, control of hepatic pathology in *schistosoma* infections or control of immunopathological lesions in viral infections [67-69]. In certain circumstances, the need to reduce or prevent serious tissue damage can compromise the ability to control infection as observed in the *Leishmania major* chronic infection [70].  $T_{reg}$  cells may thus play a crucial role in maintaining long-term, balanced host/pathogen relationships, and therefore in the promotion of commensalism.

Although there have been some considerable advances in understanding the host response to *Plasmodium*, it is not yet known which parameter to evaluate for immunity, what mechanisms regulate immune pathology in semi-immune individuals, what (if any) defects contribute to the relatively ineffective immunity in children and why immunity to *P. falciparum* infection can apparently be short-lived.

### C. Lung inflammatory response

The lung is an organ in contact with the outside environment and, therefore, highly exposed to external aggressions. This organ is an important site of host defence with a highly developed immune system that contains numerous neutrophils and other leukocytes in the capillaries. Healthy, a variety of mechanisms exists to inhibit the occurrence of inappropriate immune response, ensuring the integrity of lung parenchymal structures. Many lung diseases are directly due to uncontrolled immune response. The analysis of mechanisms protecting the lung in pulmonary diseases could help to better understand mechanisms involved in the development of respiratory distress during malaria infection. The latter may be detected earlier to avoid vital deficiencies.

#### 1. Immune cells involved in the maintenance of lung achievement

We will make a survey of the main defences involved in response to lung damage in two obstructive diseases (asthma and COPD) for which immunological mechanisms are well-known. These data will be compared to the current knowledge in malaria.

Asthma and COPD involve chronic inflammation of the respiratory tract, which is mediated by the increased expression of multiple inflammatory proteins. Despite the similarity of some clinical features, asthma and COPD have specific differences in the pattern of inflammation that occurs in the respiratory tract. These differences seem to be linked to differences in their immunological mechanisms, inducing different responses to therapy.

##### a) Mast cells

The main role of mast cells is the orchestration of allergic responses but they also play an important role in inflammation and in host defence against pathogens. The mast cells have large granules in their cytoplasm, released when the cells are activated helping to induce inflammation.

Inhaled allergens activate sensitized mast cells by crosslinking surface-bound IgE molecules to release several bronchoconstrictor mediators including histamine and lipid mediators (leukotrienes and prostaglandin), which are synthesized following mast-cell activation. The cysteinyl leukotrienes (e.g. LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> and LTE<sub>4</sub>) are the most consistently reliable biomarkers of inflammation, oxidative stress, airway remodelling and predictors of response to asthma. Mucosal mast cells are recruited to the airways surface by stem-cell factor released from epithelial cells. Allergens are processed by myeloid DCs, which are conditioned by thymic stromal lymphopoietin secreted by epithelial cells and mast cells to release the CC-chemokine ligand 17 and 22. The

release of these chemokines attracts Th2 cells. Th2 cells have a central role in regulating the allergic inflammation through the release of cytokines: (i) IL-4 and IL-13 stimulate B cells to synthesize IgE, (ii) IL-5 is necessary for eosinophil differentiation and (iii) IL-9 stimulates mast-cell proliferation [71, 72]. The presence of mast cells in the airway smooth muscle has been linked to airway hyper-responsiveness in asthma but does not seem to have a role in COPD [73, 74].

It was also reported that mast cells are the main source of vascular endothelial growth factor (VEGF), known for its regulatory activity of vessel permeability and its growth factor activity [75]. A recent study showed that VEGF and its receptor-related molecules are overexpressed in the brain tissues of CM patients, probably reflecting compensatory mechanisms of general and focal brain hypoxia observed in these patients [76]. Plasma levels of VEGF and the soluble form of the VEGF receptor-2 were also significantly elevated in uncomplicated malaria (UM) patients compared to healthy adults [77]. Furuta *et al.* confirmed *in vitro* that malarial parasite antigens induce VEGF secretion from the human mast cells. The mast cells can be also a major source of TNF- $\alpha$ , which is associated with disease severity in malaria (see above) [78]. It was also reported that *Plasmodium* 2-Cys peroxiredoxin, an important enzyme involved in the detoxification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO derived from malarial parasites, contains a protein ligand for TLR-4 and induces an acquired immune response as well as innate immunity [79]. These results support the importance of mast cell activation through TLR-4 or the binding of Fc $\epsilon$ R<sub>1</sub> (high affinity IgE receptor) to induce TNF- $\alpha$  with IgE mediated protection [79, 80]. Mast cells seem to be involved in mediating protection from malaria and in disease progression. Despite these observations, little is known about the relationship between mast cells and the pathogenesis of malaria.

#### **b) Macrophages**

Monocytes and macrophages constitute one of three types of immune system phagocytes, the others are the granulocytes and the DCs. Macrophages are relatively long-lived cells regulated in particular by alveolar endothelial cells (ECs). They perform different functions throughout the innate immune response (phagocytic role) and the subsequent adaptive immune response (presentation of pathogens and infected cells). These cells are also characterized by their long-recognized immunosuppressive activities on lymphocytes. Both monocytes and macrophages have phagocytic properties, but most infections occur in the tissues, where macrophages primarily perform this important protective function.

Macrophages are central to the pathogenesis of bronchial asthma and COPD. Indeed, inhaled cigarette smoke and other irritants activate epithelial cells and macrophages which release several chemotactic factors that attract inflammatory cells (neutrophils, monocytes and T cells) to the lungs. Epithelial cells and macrophages release TGF- $\beta$ , which stimulates fibroblast proliferation resulting in fibrosis in the small airways.

Macrophages appear to be implicated in various mechanisms during malaria infection, with a dual role. Macrophages are involved in blood coagulation and tissue repair by up-regulation of tissue factors in diseases, as sepsis or malaria [81, 82]. In malaria, after activation by IFN- $\gamma$  and/or *P. falciparum* proteins (as PfGPI and hemozoin), macrophages participate to the clearance of parasites in the phagocytosis of pRBCs, the production of NO and endogenous pyrogens (TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6, neopterin). This leads to an inflammatory cascade and enhance human myeloid DCs maturation [83-85]. Macrophages also appear to protect erythroid cells from the effect of hemozoin that delayed expression of the erythroid markers and increased apoptosis of progenitor cells which can induce severe anaemia [85]. Interestingly, a low macrophage density and a reduced blood velocity with reduced shear forces in the lungs would promote the release of merozoites into the lung microvasculature

rather than into larger blood vessels and therefore, enhance the ability of merozoites to invade erythrocytes [86]. Nevertheless, a post-mortem examination showed congestion of alveolar capillaries by heavy monocytic infiltrates in *P.vivax* malaria infection that could be responsible of inflammatory lesions to the endothelium of the lungs [87].

### *c) Granulocytes*

The granulocytes are the second type of phagocytic cell including three types of cells: neutrophils, eosinophils and basophils distinguished by the different staining properties of their granules and by their protective functions. The phagocytic neutrophils are the most numerous and most important cells in innate immune response. These cells phagocytose a variety of microorganisms and efficiently eliminate them in intracellular vesicles using degradative enzymes and other antimicrobial substances stored in their cytoplasmic granules. The protective functions of eosinophils and basophils, less well understood, are important mainly in defence against invading organisms as parasites, which are too large to be ingested by macrophages or neutrophils. Only very small numbers of eosinophils are normally present in the circulation. Most eosinophils are found in tissues, especially in the connective tissue immediately underneath respiratory, gut and urogenital epithelium. Eosinophils have two effector functions. First, they release highly toxic granule proteins and free radicals, which can kill microorganisms and parasites but also cause significant tissue damage in allergic reactions. Second, their activation induces the synthesis of chemical mediators such as prostaglandins, leukotrienes and cytokines. These last amplify the inflammatory response by epithelial cells activating and by recruiting more activated eosinophils and leukocytes. Eosinophils also secrete a number of proteins involved in airway tissue remodelling [88].

The inflammation that occurs in asthma is often described as eosinophilic, whereas that occurring in COPD is neutrophilic. These differences reflect the secretion of different chemotactic factors in these diseases. In asthma, eosinophil chemotactic factors, such as eotaxin-1 and related CC-chemokines, are mainly secreted by airway epithelial cells. Subepithelial fibrosis is observed in eosinophilic bronchitis, suggesting a role for eosinophils in airway fibrosis [89]. In COPD, the increase of neutrophils in the sputum is correlated with disease severity [90]. This is related to an increase in the production of CXC-chemokines, such as GRO $\alpha$  and IL-8, which act on their receptor (CXCR 2) expressed predominantly by neutrophils. Neutrophils should also be regarded as effectors in malaria pathogenesis [91]. Neutrophils interact with coagulation proteins, and plasma neutrophil elastase (known to cause mucus hypersecretion) is increased in patients with SM that may contribute to the pathogenesis [91, 92]. Moreover, the interaction between neutrophils and platelets in the presence of lipopolysaccharides increases neutrophil-mediated production of reactive oxygen species (ROS) and secretion of IL-8 [93].

### *d) Dendritic cells*

The DCs are the third class of phagocytic cell of the immune system. Immature DCs migrate through the bloodstream from the bone marrow to enter tissues. Like macrophages and phagocytes, these cells degrade the pathogens, but their main role in the immune system is not the clearance of microorganisms. Instead, DCs that have encountered invading microorganisms acquire the ability to activate a particular class of lymphocytes, the T lymphocytes. Heterogeneous DCs (myeloid and plasmacytoid), present in the lung in relatively small numbers, play a central role in the immune response during infection/inflammation [94, 95]. Not surprisingly, the phenotypic heterogeneity of lung DCs associates with specialized immune functions. Indeed, DCs are implicated in a number of lung inflammatory diseases in human (asthma, COPD, lung cancer, malaria, toxins or transplant

rejection). For example, anthrax toxins might modify the balance of signals in DCs, inducing the terminal differentiation of T cells toward Th2 rather than Th1, associated with blocking the production of IL-12 and TNF- $\alpha$  but not affecting the production of IL-10 or humoral immune responses [96]. Moreover, DCs migrate to the lung where they not only maintain local immune response but enhance and regulate it. Besides the immunosuppressive effects of DCs observed in malaria (seen in “peripheral inflammatory response section”), they could also play a role in the pathophysiology of indirect ARDS. Moreover, a large amount of antigens during malaria infection and an inappropriate priming and excessive apoptosis may lead to defective T cell memory [63, 97]. The investigation of the biology of DCs and the identification of the specific DCs subsets involved in T cell priming in malaria-specific organs could provide a better understanding of its role.

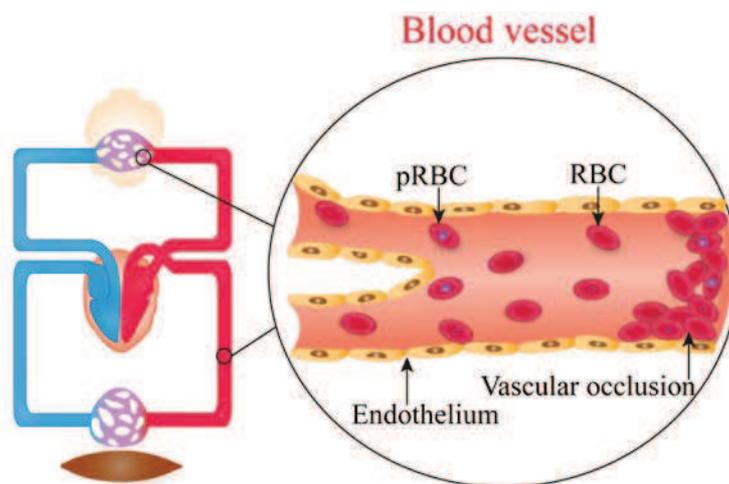
#### e) *T cells*

Without infection, most of lymphocytes circulating in the body are naive cells. The T-cell differentiation into fully functional lymphocytes is initiated when a naive lymphocyte meets an activated antigen-presenting cell displaying the appropriate peptide (MHC ligand), so naming them effector lymphocytes. The two type of lymphocytes, B lymphocytes (B cells) and T lymphocytes (T cells), have different roles in the immune system and distinct types of antigen receptors. T cells are composed of CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells. The CD8<sup>+</sup> T cells generate cytotoxic T cells capable of killing pathogen-infected cells. The CD4<sup>+</sup> T cells differentiate into several effector types of Th-cells depending on the nature of the signals received during their priming. The main functional subsets of CD4<sup>+</sup> T cells are Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells, defined by their pattern of cytokines production and function. The cytokine response is able to activate B cells and macrophages. Th1 and Th2 cells stimulate the production of antibodies against extracellular pathogens by producing co-stimulation signals for antigen-activated naive B cells and by inducing class switching to produce particular antibody isotypes as IgE class for Th2. This IgE class fights parasite infections and regulates the allergic inflammation [72]. Th1 cells also control bacteria that can set up intravascular infections in macrophages. Th17 cells are induced early in the adaptive immune response to extracellular bacteria and seem to be involved in stimulating the neutrophil response [52].

In asthmatic patients, Th2 cells are increased in the airways, whereas Th1 cells predominate in healthy [98]. In contrast to asthma, the CD4<sup>+</sup> T cells that accumulate in the airways and lungs of patients with COPD are mainly Th1 cells. Th1 cells express the chemokine receptor CXCR3 and may be attracted to the lungs by the IFN- $\gamma$ -induced release of high levels of the CXCR3 ligands (MIG, IP-10 and I-TAC) [99]. However, Th2 cells appear increased in lavage fluid of patients with COPD and Th1 cells are activated in patients with severe asthma [100]. T cells seem play a central role in both immunity and pathology of malaria [101]. Th1-derived IFN- $\gamma$  have been shown to enhance phagocytosis of pRBCs and to inhibit the parasite growth, beneficial role in the pathogenesis especially in liver-stage immunity [102]. Moreover, the CD8<sup>+</sup> T cells seem to trigger a novel adaptive immunity which is dependent not only on IFN- $\gamma$  and NO, but also on IL-12 and in part on NK cells [103]. Nevertheless, other studies highlight a pathological role for T cells (with an excessive proliferation), contributing to development of severe disease as CM [46]. Although increases in the number of circulating T cells have been reported in patients with acute *P. falciparum* malaria, their role in the pathogenesis of human malaria is yet to be determined [55, 104].

## 2. Sequestration phenomena

Several potential factors influence gas transfer such as alterations in pulmonary capillary blood flow and haemoglobin concentration, injury to capillary endothelial or alveolar epithelial cells, infiltration of the alveolar space or lung interstitium, and reducing alveolar ventilation [105]. Many of these factors may be involved in the *P. falciparum* malaria physiopathology. In asthmatic patients, the airflow obstruction is greater than in patients with malaria, while the diffusing capacity and pulmonary capillary blood volume remain normal [106]. One hypothesis advanced to reduce pulmonary capillary blood flow is the microvascular sequestration of cytoadherent blood cells, either pRBCs or leukocytes (Fig. 2).



**Fig. (2).** Phenomenon of microvascular sequestration of erythrocytes in blood vessels.

The balance between endothelial activation and endothelial protection is considered as a critical factor in the severity of malaria. The phenomenon of sequestration is mainly caused by the cytoadherence of pRBCs to the ECs lining blood vessels, a process named “cytoadherence” (Fig. 2). In malaria, sequestration in deep microvasculature induces a microaerophilic venous environment more suited for parasite development. Cytoadherence and consequent accumulation of late stage pRBCs in the capillaries may obstruct microcirculatory blood flow, leading to metabolic dysfunction, locally diminished tissue perfusion and finally organ failure. This phenomenon induces the activation of many deleterious cascades such as oxidative stress via mitochondrial ROS production, signalling to induce “hyperadhesion” phenomenon, endothelium activation and apoptosis [107-109]. The loss of integrity due to cytoadherence can compromise blood-brain barrier function either directly by pRBCs or PBMCs adhesion, by indirect mechanisms including binding via platelets, or by the production of microparticles from ECs activated by adhering pRBCs [14, 110, 111].

Erythrocytes have the ability to adhere to ECs through the presence of plasma factors (fibrinogen and fibronectin), and this adhesion can induce *in vitro* a low expression of ICAM-1 [112]. *In vivo*, ICAM-1 gene is overexpressed in response to various inflammatory mediators such as TNF- $\alpha$  and IL-1 and is associated with sequestration in brain capillaries in CM [113]. CD36, found on various host cells including ECs, monocytes and platelets, is associated with UM [113]. The capacity to cytoadhere at vascular endothelium through the interaction of PfEMP-1 with the surface receptors of host cells induces mechanical obstruction responsible of a

lung dysfunction. In parallel, the recruitment of pro-inflammatory cytokines, coagulation factors and leukocyte adhesion at inflammatory sites propagate inflammation in tissues contributing to the pathology [114].

As pRBCs in *P. vivax* or *P. ovale* do not cytoadhere to ECs, the occurrence of ARDS in *P. vivax* malaria suggests that lung injury is not caused only by microvascular sequestration of pRBCs [4, 19]. As mentioned before, PfGPI and hemozoin, released during the rupture of the erythrocytes, are recognized by the humoral response and activate the secretion of pro-inflammatory mediators (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) and the production of ROS [115-117]. Maguire *et al.* have proposed that different levels of ARDS in malaria correspond to a continuous spectrum from UM to SM [15]. According to these authors, in SM patients without ARDS, it exists an endovascular obstruction caused by weakly deformed erythrocytes, pRBCs and PBMCs. Endothelial and interstitial oedemas result in ventilation-perfusion mismatch and impairment of gas exchange. Worsening or persistence of these gas exchange abnormalities after treatment and beyond the expected time of clearance of pRBCs reflects a prolonged inflammatory response at the origin of ARDS [15]. Moreover, pRBCs sequestration in lung is lower than in other organs, as the brain [118, 119]. These authors report that sequestered pRBCs founded in alveolar capillaries are more frequently in ring or early trophozoite stages and are associated with numerous neutrophils, monocytes and lymphocytes. On the contrary, in cerebral vessels, sequestered forms are mainly late trophozoites and schizonts [118, 120]. Inflammatory responses to *P. falciparum* and *P. vivax* malaria were also compared in a lung study, showing an alveolar-capillary dysfunction after *P. vivax* treatment, consistent with a higher inflammatory response to *P. vivax* than *P. falciparum* for a same parasitemia [14]. In addition to the role played by pro- and anti-inflammatory cytokines and by neutrophil and macrophage activation, a potential role for NO in the genesis of ischemic hypoxia has been postulated [21, 121]. The interaction and interdependence of these pathological pathways are, at least in part, responsible for the formation of oedema in capillaries, and organ dysfunction, as brain and lungs, leading to coma and respiratory distress [114].

#### **D. Animals model contribution in the comprehension of respiratory distress**

Animal models infected with *P. berghei* ANKA strain (*PbA*) provide a useful tool for studying certain aspects of the human CM, anaemia syndromes and pregnancy-associated malaria [122, 123]. These models have shown that both sequestration and parasite-derived products play key roles in the pathogenesis of malaria lung pathology, by causing inflammation and endothelial damage [124, 125]. Despite the manifestation of lung damage as pulmonary oedema, the development and rapid progression of CM in these mice make it difficult to study the mechanisms leading to lung complications [125-128]. Recently, this has been resolved by using two strain of mice respectively infected with *P. berghei* ANKA and NK65. DBA/2 mice are resistant to experimental CM but susceptible to lung complications, and C57BL/6 ones produce pathology resembling ARDS-associated malaria in humans without any cerebral symptoms [24, 129]. The DBA/2 mice have allowed to observe not only dyspnoea before death but also airway obstruction, hypoxemia ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$  mmHg), pleural effusion, pulmonary haemorrhage and oedema, and increased lung vessel permeability [24]. In this model, ARDS is associated with high levels of circulating VEGF and its blockade lead to protection of mice from this syndrome, giving hope for new treatments of this form of SM. Indeed, systemic overexpression of VEGF was appeared to cause widespread capillary leakage in multiple organs, especially in the lung [130]. VEGF plays not only a critical role in angiogenesis but also in vascular permeability by increasing it 50,000 times more efficiently than

histamine [131, 132]. Interestingly, VEGF also plays a central role in the formation and maintenance of lung vasculature [133]. A perturbation of the VEGF level induces lung abnormality. However, it can be observed a strongly elevated plasmatic VEGF (values two-fold higher) associated with high mortality in patients with non-malaria ARDS [134]. The association between VEGF levels and mortality due to respiratory failure does not mean that VEGF effects are restricted to the lung, but highlights the importance of vascular integrity for lung function.

In rodent model, while severe pulmonary oedema and haemorrhages were observed in 100% of ARDS cases, these symptoms were rare in mice dying with experimental CM and were never extensive or severe enough to constitute the cause of death. Altogether, these data show that the two experimental syndromes are distinct [24]. Major histopathological changes in the lungs of DBA/2 mice after the onset of ARDS are characterized by inflammatory cellular infiltration (neutrophil-dominant and foamy macrophages in the alveolar and interstitial sites) as well as marked alveolar oedema and haemorrhage. These characteristics of ARDS-associated malaria, observed also with PbNK65 in C57BL/6, are associated with an increase of lung weight, vascular permeabilization, hyaline membrane formation and the number of lymphocytes [129]. The observations of these authors are clearly in agreement with pathophysiological findings in patients, showing mononuclear cells and granulocytes in pulmonary vessels, intra-alveolar microhemorrhages and hyaline membrane formation [87, 118, 135, 136]. Additional similarities between the human ARDS-associated malaria and the C57BL/6 murine model include the high degree of lethality (~80%) and hypoalbuminemia, which is considered a common aggravating factor in patients [136, 137].

The aggravation of disease due to lung failure is difficult to prevent. The numerous studies on lung physiopathology in malaria do not allow to really understand its involvement, its mechanism of action and above all, the inflammatory response associated. Lung damages are often difficult to evaluate and the most of pulmonary explorations are invasive and limited.

### **III. Lung injury exploration**

In addition to a historic health check and physical examination, physicians inquire about patient's exercise capacity, symptoms such as breathlessness and cough, and clinical examination of lungs and heart. But, a number of tests might be performed to determine the presence of lung injuries and to estimate the degree of impairment. Therefore, new techniques investigating more lung injuries and preventing aggravating risks should be considered.

#### **E. Pulmonary function tests or spirometry**

Pulmonary function tests are a group of tests that are noninvasive and usually performed as an outpatient treatment in respirology. These tests consist in breathing into a tube via a mouthpiece. Lung function is measured using a pulmonary function testing station. Analysis of pulmonary function tests such as the Forced Vital Capacity (FVC, the total amount of air patient can blow out forcefully) and the Diffusion Capacity for Carbon Monoxide (DLCO, a measure of how well diffused oxygen into the blood) help physician to determine the presence and the severity of restriction of the lungs. In interstitial lung diseases, restriction is a characteristic

abnormality, leading to a decrease (below 80% predicted) in the FVC and DLCO. Spirometry is routinely performed as part of a baseline evaluation to diagnose obstruction of the airway in COPD, cigarette smoking, asthma and ambient air pollution [138-140]. This technique was also successfully assessed in malaria to measure the impact of *P. falciparum* and *P. vivax* infection at the lung level [26]. This study has highlighted common lung function impairment in human infected by *Plasmodium* species with small airways obstruction, impaired alveolar ventilation and reduced gas transfer [26]. The test is highly dependent on patient cooperation and need to be repeated at least three times to ensure reproducibility. It can only be used on patients who are able to understand and follow instructions like adults or children  $\geq 6$  years old, but not if they are unconscious, heavily sedated, or have limitations that would interfere with respiratory efforts. Consequently, this test is not suitable for ARDS in malaria.

#### **F. Bronchoalveolar lavage**

Bronchoscopy with bronchoalveolar lavage (BAL) is a more invasive test that may also provide information about the degree of inflammation in the lungs. BAL is performed by a pulmonologist during fiberoptic bronchoscopy, usually on an outpatient and with conscious sedation in the pulmonary resuscitation. One or more segments of the lungs are washed with a sterile salt water solution which is then recovered and analysed for the types of cells and proteins from the alveoli or air sacs [141]. Obtained biofluids correlate the expression of normally secreted pulmonary proteins and the products of activated cells and of destructive processes. BAL is presently the most common way of sampling the components of the epithelial lining fluid and the most faithful image of the pulmonary airways protein composition. The characterization of the proteome within this compartment provides an opportunity to establish temporal and prognostic indicators of airway diseases and an early detection of lung cancer [142, 143]. BAL is one of rare technique which enables to collect lung cellular components, in order to study lung injury at cellular level. The main inconvenient for this examination is that it should be performed only at specialized centers, able of analysing and interpreting the results. This method has become the “gold standard” for measuring inflammation in the lung. Nevertheless the invasive nature of bronchoscopy has led to a constant search for less intrusive methods easier to implement [144].

#### **G. Sputum induction**

Biological fluids (such as blood or urine) can be collected to identify biomarkers of lung diseases, such as inflammatory products and other mediators [145]. However, through systemic samplings, it is not always possible to achieve a sufficient specificity and sensitivity in order to get insights into disease processes occurring in the lung. A more direct evaluation of lung inflammation can be used by mean of sputum induction. The induction of sputum is relatively reproducible and allows to analyse the airway samples composition and to quantify inflammatory cells and mediators. Like with BAL, it provide airway cellular components. Induced sputum collection and their analysis are generally well tolerated by patients [146]. Collection of sputum induced by inhalation of hypertonic saline solution can give direct information on the type and the degree of bronchial inflammation, and brought to better understand the role of inflammatory mediators found in the COPD and asthmatic patients [147]. However, this technique cause inflammation itself because of inhalation of hypertonic

saline like with BAL which induce coughing and broncho-constriction, and so cannot be used for repeated measurements.

### H. Exhaled breath condensate

Examination of exhaled breath offers a fourth method for assessment of airway inflammation that is essentially used in fundamental and clinical researches. Exhaled breath can be sampled in a gaseous phase like for measurement of exhaled NO, or in a liquid phase obtained by condensing it on cool surface, also named exhaled breath condensate (EBC). For EBC collection, patient breathes normally into a mouthpiece attached to a cold condensing apparatus. When this warm exhaled air circulates through the cold condenser, it precipitates into droplets. This precipitate is mainly constituted by water, but also contained small droplets of airway lining fluid. The latter contains variable quantities of hydrophobic and hydrophilic compounds in relation to their molecular size and chemical properties, the rate and depth of the breath, the temperature of the exhaled air and the turbulence created by the breath on its way out of the trachea-bronchial tree. Several volatile and nonvolatile compounds from the central and peripheral airways (such as prostaglandins and cytokines) as well as the alveolar membrane (such as surfactant proteins) have been detected in EBC and are listed in the following Table 3. EBC does not contain any cells. EBC collection is a completely noninvasive technique to sample the airway lining fluid, and its collection does not cause any discomfort or risk to examined subjects, even for children of  $\geq 4$  years and adults with severe lung disease [148-153]. Another advantage is that the acquisition of EBC itself does not influence airway inflammation, contrary to sputum induction and BAL [148]. The physical properties of the device, in which the exhaled air is condensed and collected, affects the quantity and composition of obtained condensates. Two devices with different properties have been patented and widely commercialized: the RTube (Respiratory Research, Inc., Austin, TX) and the EcoScreen (VIASYS Healthcare, Yorba Linda, CA). A third device (ANACON, Biostec, Valencia, Spain) is available but not routinely used. EBC analysis needs the use of sensitive assays with minimal variability as multiplex bead array or high liquid chromatography combined or not with electrospray ionization tandem mass spectrometry [154, 155]. EBC collection and analysis have not yet been standardized, leading to inter-center variability in normal and pathological values. Nevertheless, EBC could be a viable noninvasively assay to investigate the deep lung environment, to predict the occurrence of respiratory pathology and to follow the patients. It could also be useful in designing interventional studies addressing the value of this biomarker as an indicator of the therapeutic response. Studies in these areas are warranted to provide early diagnosis, to stratify patients at risk and finally, to provide the best clinical outcome for patients.

Table 3. Overview of EBC biomarkers investigated and monitored in lung injury with diseases associated.

Markers	Meaning	Methods	Conditions	References
Hydrogen peroxide	Cell released oxidant	Colorimetric or fluorometric methods	Asthma, COPD, bronchiectasis, cystic fibrosis, ARDS	[151]
Nitrotyrosine	Nitrosative stress biomarker	Enzyme immunoassay (EIA), mass spectrometry (MS) techniques	Asthma, cystic fibrosis	[156]
Eicosanoids	Arachidonic acid	EIA, radioimmunoassay, High	Asthma, COPD	[155, 157-159]

	derived inflammatory mediators	Performance Chromatography (HPLC)	Liquid	
8-isoprostane	Lipid peroxidation biomarker	EIA and chromatography/MS	gas	Asthma, COPD, cystic fibrosis, ozone exposure, obstructive sleep apnea, ARDS [160, 161]
Aldehydes	Lipid peroxidation biomarker	Liquid chromatography-tandem MS		Asthma, COPD, workers to hard metals [162, 163]
Glutathione	Anti-oxidant	HPLC		Asthma
pH	Airway acidity pH	electrodes and indicator dyes		Asthma, COPD, cystic fibrosis
Cytokines	Inflammatory mediators	EIA		COPD, lung cancer, after lung surgery, ARDS [164]
Toxic metallic elements	Biomarkers of exposure	Electrothermal atomic absorption Spectroscopy (ETAS) and Inductively coupled plasma –MS (ICP-MS)		Workers exposed to hard metals [165]

Non-invasive techniques such as induced sputum, EBC and exhaled NO are being increasingly used to identify biomarkers which are a link between the effects of smoking and the development of airflow obstruction. These techniques are safe and easily repeatable. Until now, mainly used in respiratory diseases, its techniques can be useful in the determination of lung damages degree in various diseases and in therapeutic monitoring to determine the outcome for the patient.

#### IV. Conclusion

ARDS-associated malaria is often ignored, diagnosed too late or attributed to other causes. So far, lung injury is mostly investigated for its physiological aspect in malaria. Nevertheless, the studies of the lung diseases as asthma or COPD illustrate that the establishment and the control of the inflammatory response are critical to the outcome of ARDS-associated malaria. Besides the requirement of improving the efficacy and safety of various mechanical ventilation strategies, the understanding of this inflammatory response appears essential. Actual data on the immunopathogenesis and the pathology of pulmonary malaria are limited. The use of lung exploration tools would be useful for the design of novel rational intervention strategies. Noninvasive techniques such as EBC could be helpful for the identification of primary biomarkers. Investigate this last technique could help to reduce the number of lung damage associated to SM, thanks to early diagnosis and new treatment options.

## V. Abbreviations

ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome

BAL: Bronchoalveolar Lavage

CM: Cerebral Malaria

COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CXCR: CXC chemokine Receptor

DCs: Dendritic Cells

DLCO: Diffusion Capacity for Carbon Monoxide

DNA: Desoxyribo- Nucleic Acid

EBC: Exhaled Breath Condensate

ECs: Endothelial Cells

FVC: Forced Vital Capacity

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1

IFN: Interferon

IL- : Interleukin-

NK: Natural Killer

NO: Nitric Oxide

*P.*: *Plasmodium*

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells

*Pf*GPI: *P. falciparum* GlycosylPhosphatidyl-Inositol

pRBCs: parasitized Red Blood Cells

PRRs: Pattern-Recognition Receptors

ROS: Reactive Oxygen Species

SM: Severe Malaria

SMA: Severe malarial anaemia

TGF: Tumor Growth Factor

Th: T helper

TLRs: Toll-Like Receptors

TNF: Tumor Necrosis Factor

UM: Uncomplicated Malaria

VEGF: Vascular Endothelium Growth Factor

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the DGA (Délégation Générale pour l'Armement) and the Direction Centrale du Service de Santé des Armées (grant no. CO PDH-2-NRBC-5-B-102).

## VI. References

- [1] WHO. World Malaria Report 2011. World Health Organization, World Malaria report 2011. 2011 2011:1-278.
- [2] Mali S, Steele S, Slutsker L, Arguin PM. Malaria surveillance - United States, 2008. MMWR Surveill Summ. 2010 Jun 25;59(7):1-15.
- [3] WHO, editor. From malaria control to elimination in the WHO European region 2006-2015. Regional office for Europe, Copenhagen, Denmark. 2006
- [4] WHO. Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000 Apr;94 Suppl 1:S1-90.
- [5] Marsh K, Forster D, Waruiru C, *et al*. Indicators of life-threatening malaria in African children. N Engl J Med. 1995 May 25;332(21):1399-404.
- [6] O'Dempsey TJ, McArdle TF, Laurence BE, Lamont AC, Todd JE, Greenwood BM. Overlap in the clinical features of pneumonia and malaria in African children. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993 Nov-Dec;87(6):662-5.
- [7] Brooks M, Kiel F, Sheehy T, Barry K. Acute pulmonary edema in *falciparum* malaria. N Engl J Med. 1968;279:732-7.
- [8] Hughes SB, Bomford DM. Clinical features and treatment of malaria in British troops in West Africa. BMJ 1944;1:69-73.
- [9] Mohan A, Sharma SK, Bollineni S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. J Vector Borne Dis. 2008 Sep;45(3):179-93.
- [10] Aursudkij B, Wilairatana P, Vannaphan S, Walsh DS, Gordeux VR, Looareesuwan S. Pulmonary edema in cerebral malaria patients in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 1998 Sep;29(3):541-5.
- [11] Nayak KC, Mohini, Kumar S, *et al*. A study on pulmonary manifestations in patients with malaria from northwestern India (Bikaner). J Vector Borne Dis. 2011 Dec;48(4):219-23.
- [12] Gerardin P, Rogier C, Ka AS, Jouvencel P, Diatta B, Imbert P. Outcome of life-threatening malaria in African children requiring endotracheal intubation. Malar J. 2007;6:51.
- [13] Taylor WR, Hanson J, Turner GD, White NJ, Dondorp AM. Respiratory manifestations of malaria. Chest. 2012 Aug;142(2):492-505.
- [14] Anstey NM, Handojo T, Pain MC, *et al*. Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation. J Infect Dis. 2007 Feb 15;195(4):589-96.
- [15] Maguire GP, Handojo T, Pain MC, *et al*. Lung injury in uncomplicated and severe falciparum malaria: a longitudinal study in papua, Indonesia. J Infect Dis. 2005 Dec 1;192(11):1966-74.
- [16] Ferguson ND, Fan E, Camporota L, *et al*. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. Intensive Care Med. 2012 Oct;38(10):1573-82.
- [17] Wegenius G. Radiology in the diagnosis of adult respiratory distress syndrome with special reference to pulmonary oedema--its distribution and detection. Acta Radiol Suppl. 1988;372:53-72.
- [18] Cayea PD, Rubin E, Teixidor HS. Atypical pulmonary malaria. AJR Am J Roentgenol. 1981 Jul;137(1):51-5.
- [19] Lomar AV, Vidal JE, Lomar FP, Barbas CV, de Matos GJ, Boulous M. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review. Braz J Infect Dis. 2005 Oct;9(5):425-30.
- [20] Beale R, Grover ER, Smithies M, Bihari D. Acute respiratory distress syndrome ("ARDS"): no more than a severe acute lung injury? BMJ. 1993 Nov 20;307(6915):1335-9.
- [21] Taylor WR, Canon V, White NJ. Pulmonary manifestations of malaria : recognition and management. Treat Respir Med. 2006;5(6):419-28.
- [22] Marsh K, English M, Crawley J, Peshu N. The pathogenesis of severe malaria in African children. Ann Trop Med Parasitol. 1996 Aug;90(4):395-402.
- [23] von Seidlein L, Olaosebikan R, Hendriksen IC, *et al*. Predicting the clinical outcome of severe falciparum malaria in african children: findings from a large randomized trial. Clin Infect Dis. 2012 Apr;54(8):1080-90.
- [24] Epiphanyo S, Campos MG, Pamplona A, *et al*. VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice. PLoS Pathog. 2010;6(5):e1000916.
- [25] Cosgriff TM. Pulmonary edema in falciparum malaria. Slaying the dragon of volume overload. Chest. 1990 Jul;98(1):10-2.
- [26] Anstey NM, Jacups SP, Cain T, *et al*. Pulmonary manifestations of uncomplicated falciparum and vivax malaria: cough, small airways obstruction, impaired gas transfer, and increased pulmonary phagocytic activity. J Infect Dis. 2002 May 1;185(9):1326-34.

- [27] Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005 Sep;5(9):722-35.
- [28] Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):169-80.
- [29] Currier J, Sattabongkot J, Good MF. 'Natural' T cells responsive to malaria: evidence implicating immunological cross-reactivity in the maintenance of TCR alpha beta+ malaria-specific responses from non-exposed donors. *Int Immunol*. 1992 Sep;4(9):985-94.
- [30] Dick S, Waterfall M, Currie J, Maddy A, Riley E. Naive human alpha beta T cells respond to membrane-associated components of malaria-infected erythrocytes by proliferation and production of interferon-gamma. *Immunology*. 1996 Jul;88(3):412-20.
- [31] Waterfall M, Black A, Riley E. Gammadelta+ T cells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites. *Infect Immun*. 1998 May;66(5):2393-8.
- [32] Zevering Y, Amante F, Smillie A, *et al*. High frequency of malaria-specific T cells in non-exposed humans. *Eur J Immunol*. 1992 Mar;22(3):689-96.
- [33] Scragg IG, Hensmann M, Bate CA, Kwiatkowski D. Early cytokine induction by *Plasmodium falciparum* is not a classical endotoxin-like process. *Eur J Immunol*. 1999 Aug;29(8):2636-44.
- [34] Hensmann M, Kwiatkowski D. Cellular basis of early cytokine response to *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2001 Apr;69(4):2364-71.
- [35] Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*. 2002 Sep 15;169(6):2956-63.
- [36] Stach JL, Dufrenoy E, Roffi J, Bach MA. T-cell subsets and natural killer activity in *Plasmodium falciparum*-infected children. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986 Jan;38(1):129-34.
- [37] Bouyou-Akotet MK, Issifou S, Meye JF, *et al*. Depressed natural killer cell cytotoxicity against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes during first pregnancies. *Clin Infect Dis*. 2004 Feb 1;38(3):342-7.
- [38] Rhee MS, Akanmori BD, Waterfall M, Riley EM. Changes in cytokine production associated with acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Exp Immunol*. 2001 Dec;126(3):503-10.
- [39] Prudencio M, Rodrigues CD, Mota MM. The relevance of host genes in malaria. *SEB Exp Biol Ser*. 2007;58:47-91.
- [40] Su X, Hayton K, Wellems TE. Genetic linkage and association analyses for trait mapping in *Plasmodium falciparum*. *Nat Rev Genet*. 2007 Jul;8(7):497-506.
- [41] Bate CA, Taverne J, Playfair JH. Malarial parasites induce TNF production by macrophages. *Immunology*. 1988 Jun;64(2):227-31.
- [42] Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, *et al*. Tumor necrosis factor and disease severity in children with *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 1989 Jun 15;320(24):1586-91.
- [43] Shaffer N, Grau GE, Hedberg K, *et al*. Tumor necrosis factor and severe malaria. *J Infect Dis*. 1991 Jan;163(1):96-101.
- [44] Kwiatkowski D. Tumour necrosis factor, fever and fatality in *falciparum* malaria. *Immunol Lett*. 1990 Aug;25(1-3):213-6.
- [45] Akanmori BD, Kurtzhals JA, Goka BQ, *et al*. Distinct patterns of cytokine regulation in discrete clinical forms of *Plasmodium falciparum* malaria. *Eur Cytokine Netw*. 2000 Mar;11(1):113-8.
- [46] Artavanis-Tsakonas K, Tongren JE, Riley EM. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clin Exp Immunol*. 2003 Aug;133(2):145-52.
- [47] Hansen DS, Schofield L. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? *PLoS Pathog*. 2010 Apr;6(4):e1000771.
- [48] Hunt NH, Grau GE. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol*. 2003 Sep;24(9):491-9.
- [49] Riley EM, Wahl S, Perkins DJ, Schofield L. Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunol*. 2006 Jan-Feb;28(1-2):35-49.
- [50] Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, *et al*. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet*. 1998 Jun 13;351(9118):1768-72.
- [51] Perkins DJ, Weinberg JB, Kremsner PG. Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity. *J Infect Dis*. 2000 Sep;182(3):988-92.
- [52] Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway's Immunobiology (Immunobiology: The Immune System (Janeway))*. 7th ed: Garland Science; 2007.
- [53] Riley EM, Stewart VA. Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development. *Nat Med*. 2013 Feb;19(2):168-78.
- [54] Walther M, Tongren JE, Andrews L, *et al*. Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*. 2005 Sep;23(3):287-96.

- [55] Sanou GS, Tiendrebeogo RW, Ouedraogo AL, *et al.* Haematological parameters, natural regulatory CD4 + CD25 + FOXP3+ T cells and gammadelta T cells among two sympatric ethnic groups having different susceptibility to malaria in Burkina Faso. *BMC Res Notes*. 2012;5:76.
- [56] Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol*. 2009 Oct;70(4):326-36.
- [57] Lin X, Chen M, Liu Y, *et al.* Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(2):116-23.
- [58] Nebl T, De Veer MJ, Schofield L. Stimulation of innate immune responses by malarial glycosylphosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology*. 2005;130 Suppl:S45-62.
- [59] Parroche P, Lauw FN, Goutagny N, *et al.* Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 6;104(6):1919-24.
- [60] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2003 Feb 17;197(4):403-11.
- [61] Hisaeda H, Tetsutani K, Imai T, *et al.* Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2496-503.
- [62] Scholzen A, Mittag D, Rogerson SJ, Cooke BM, Plebanski M. Plasmodium falciparum-mediated induction of human CD25Foxp3 CD4 T cells is independent of direct TCR stimulation and requires IL-2, IL-10 and TGFbeta. *PLoS Pathog*. 2009 Aug;5(8):e1000543.
- [63] Elliott SR, Spurck TP, Dodin JM, *et al.* Inhibition of dendritic cell maturation by malaria is dose dependent and does not require Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun*. 2007 Jul;75(7):3621-32.
- [64] Urban BC, Cordery D, Shafi MJ, *et al.* The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria. *Infect Immun*. 2006 Dec;74(12):6700-6.
- [65] Jangpatarapongsa K, Chootong P, Sattabongkot J, *et al.* Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2008 Oct;38(10):2697-705.
- [66] Torcia MG, Santarlasci V, Cosmi L, *et al.* Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to Plasmodium falciparum malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 15;105(2):646-51.
- [67] Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, *et al.* The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):3157-66.
- [68] McKinley L, Logar AJ, McAllister F, Zheng M, Steele C, Kolls JK. Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of pneumocystis pneumonia. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):6215-26.
- [69] Suvas S, Azkur AK, Kim BS, Kumaraguru U, Rouse BT. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4123-32.
- [70] Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature*. 2002 Dec 5;420(6915):502-7.
- [71] Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldeston MA, Piliponsky AM, Williams CM, Tsai M. Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:749-86.
- [72] Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy*. 2006;91:59-75.
- [73] Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med*. 2002 May 30;346(22):1699-705.
- [74] Green RH, Brightling CE, Woltmann G, Parker D, Wardlaw AJ, Pavord ID. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*. 2002 Oct;57(10):875-9.
- [75] Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, *et al.* Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*. 1998 Mar;4(3):336-40.
- [76] Deininger MH, Winkler S, Kreamsner PG, Meyermann R, Schluesener HJ. Angiogenic proteins in brains of patients who died with cerebral malaria. *J Neuroimmunol*. 2003 Sep;142(1-2):101-11.
- [77] Furuta T, Kimura M, Watanabe N. Elevated levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2 in human malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2010 Jan;82(1):136-9.
- [78] Zhang Y, Ramos BF, Jakschik BA. Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1957-9.
- [79] Furuta T, Imajo-Ohmi S, Fukuda H, Kano S, Miyake K, Watanabe N. Mast cell-mediated immune responses through IgE antibody and Toll-like receptor 4 by malarial peroxiredoxin. *Eur J Immunol*. 2008 May;38(5):1341-50.

- [80] Furuta T, Kikuchi T, Iwakura Y, Watanabe N. Protective roles of mast cells and mast cell-derived TNF in murine malaria. *J Immunol*. 2006 Sep 1;177(5):3294-302.
- [81] Opal SM, Esmon CT. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care*. 2003 Feb;7(1):23-38.
- [82] Francischetti IM, Seydel KB, Monteiro RQ. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation*. 2008 Feb;15(2):81-107.
- [83] Zhu J, Krishnegowda G, Gowda DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: the requirement of extracellular signal-regulated kinase, p38, c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB pathways for the expression of proinflammatory cytokines and nitric oxide. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):8617-27.
- [84] Kumar S, Gowda NM, Wu X, Gowda RN, Gowda DC. CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells. *Parasite Immunol*. 2012 Jul;34(7):372-82.
- [85] Lamikanra AA, Theron M, Kooij TW, Roberts DJ. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors. *PLoS ONE*. 2009;4(12):e8446.
- [86] Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevert U. Release of hepatic *Plasmodium yoelii* merozoites into the pulmonary microvasculature. *PLoS Pathog*. 2007 Nov;3(11):e171.
- [87] Valecha N, Pinto RG, Turner GD, *et al*. Histopathology of fatal respiratory distress caused by *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2009 Nov;81(5):758-62.
- [88] Zagai U, Skold CM, Trulsson A, Venge P, Lundahl J. The effect of eosinophils on collagen gel contraction and implications for tissue remodelling. *Clin Exp Immunol*. 2004 Mar;135(3):427-33.
- [89] Schulze J, Voss S, Zissler U, Rose MA, Zielen S, Schubert R. Airway responses and inflammation in subjects with asthma after four days of repeated high-single-dose allergen challenge. *Respir Res*. 2012;13:78.
- [90] Milara J, Juan G, Peiro T, Serrano A, Cortijo J. Neutrophil activation in severe, early-onset COPD patients versus healthy non-smoker subjects in vitro: effects of antioxidant therapy. *Respiration*. 2012;83(2):147-58.
- [91] Gillis S, Furie BC, Furie B. Interactions of neutrophils and coagulation proteins. *Semin Hematol*. 1997 Oct;34(4):336-42.
- [92] Mohanty D, Ghosh K, Nandwani SK, *et al*. Fibrinolysis, inhibitors of blood coagulation, and monocyte derived coagulant activity in acute malaria. *Am J Hematol*. 1997 Jan;54(1):23-9.
- [93] Haselmayer P, Grosse-Hovest L, von Landenberg P, Schild H, Radsak MP. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):1029-35.
- [94] GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal Immunol*. 2008 Nov;1(6):442-50.
- [95] Heath WR, Carbone FR. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol*. 2009 Dec;10(12):1237-44.
- [96] Tournier JN, Quesnel-Hellmann A, Mathieu J, *et al*. Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. *J Immunol*. 2005 Apr 15;174(8):4934-41.
- [97] Xu H, Wipasa J, Yan H, *et al*. The mechanism and significance of deletion of parasite-specific CD4(+) T cells in malaria infection. *J Exp Med*. 2002 Apr 1;195(7):881-92.
- [98] Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med*. 2008;59:281-92.
- [99] Costa C, Rufino R, Traves SL, Lapa ESJR, Barnes PJ, Donnelly LE. CXCR3 and CCR5 chemokines in induced sputum from patients with COPD. *Chest*. 2008 Jan;133(1):26-33.
- [100] Barczyk A, Pierzchala W, Kon OM, Cosio B, Adcock IM, Barnes PJ. Cytokine production by bronchoalveolar lavage T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;117(6):1484-92.
- [101] Omer FM, Kurtzhals JA, Riley EM. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? *Parasitol Today*. 2000 Jan;16(1):18-23.
- [102] Tsuji M, Zavala F. T cells as mediators of protective immunity against liver stages of *Plasmodium*. *Trends Parasitol*. 2003 Feb;19(2):88-93.
- [103] Doolan DL, Hoffman SL. IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol*. 1999 Jul 15;163(2):884-92.
- [104] Stevenson MM, Ing R, Berretta F, Miu J. Regulating the adaptive immune response to blood-stage malaria: role of dendritic cells and CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Biol Sci*. 2011;7(9):1311-22.
- [105] Hughes JM, Bates DV. Historical review: the carbon monoxide diffusing capacity (DLCO) and its membrane (DM) and red cell (Theta.Vc) components. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003 Nov 14;138(2-3):115-42.
- [106] Kaminsky DA, Lynn M. Pulmonary capillary blood volume in hyperpnea-induced bronchospasm. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Nov;162(5):1668-73.

- [107] Jenkins N, Wu Y, Chakravorty S, Kai O, Marsh K, Craig A. Plasmodium falciparum intercellular adhesion molecule-1-based cytoadherence-related signaling in human endothelial cells. *J Infect Dis.* 2007 Jul 15;196(2):321-7.
- [108] Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, Dugas B, Mazier D. Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec;1010:582-6.
- [109] Tripathi AK, Sullivan DJ, Stins MF. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. *Infect Immun.* 2006 Jun;74(6):3262-70.
- [110] Taoufiq Z, Gay F, Balvanyos J, *et al.* Rho kinase inhibition in severe malaria: thwarting parasite-induced collateral damage to endothelia. *J Infect Dis.* 2008 Apr 1;197(7):1062-73.
- [111] Wassmer SC, Lepolard C, Traore B, Pouvelle B, Gysin J, Grau GE. Platelets reorient Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells. *J Infect Dis.* 2004 Jan 15;189(2):180-9.
- [112] Brown MD, Wick TM, Eckman JR. Activation of vascular endothelial cell adhesion molecule expression by sickle blood cells. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2001 Jan-Feb;20(1):47-72.
- [113] Ochola LB, Siddondo BR, Ocholla H, *et al.* Specific receptor usage in Plasmodium falciparum cytoadherence is associated with disease outcome. *PLoS ONE.* 2011;6(3):e14741.
- [114] van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol.* 2006 Nov;22(11):503-8.
- [115] Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, *et al.* Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem.* 2005 Mar 4;280(9):8606-16.
- [116] Patel SN, Lu Z, Ayi K, Serghides L, Gowda DC, Kain KC. Disruption of CD36 impairs cytokine response to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo. *J Immunol.* 2007 Mar 15;178(6):3954-61.
- [117] Coban C, Ishii KJ, Kawai T, *et al.* Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 2005 Jan 3;201(1):19-25.
- [118] MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol.* 1985 Jun;119(3):385-401.
- [119] Carr RA, Lucas S, Liomba N. Lung pathology in fatal pediatric malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(Suppl 1):269-70.
- [120] Miller LH. Distribution of mature trophozoites and schizonts of Plasmodium falciparum in the organs of Aotus trivirgatus, the night monkey. *Am J Trop Med Hyg.* 1969 Nov;18(6):860-5.
- [121] Day NP, Hien TT, Schollaardt T, *et al.* The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis.* 1999 Oct;180(4):1288-97.
- [122] Lamikanra AA, Brown D, Potocnik A, Casals-Pascual C, Langhorne J, Roberts DJ. Malarial anemia: of mice and men. *Blood.* 2007 Jul 1;110(1):18-28.
- [123] Neres R, Marinho CR, Goncalves LA, Catarino MB, Penha-Goncalves C. Pregnancy outcome and placenta pathology in Plasmodium berghei ANKA infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant women. *PLoS ONE.* 2008;3(2):e1608.
- [124] Franke-Fayard B, Fonager J, Braks A, Khan SM, Janse CJ. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: can we learn anything from rodent models of malaria? *PLoS Pathog.* 2010;6(9).
- [125] Lovegrove FE, Gharib SA, Pena-Castillo L, *et al.* Parasite burden and CD36-mediated sequestration are determinants of acute lung injury in an experimental malaria model. *PLoS Pathog.* 2008 May;4(5):e1000068.
- [126] Chang WL, Jones SP, Lefer DJ, *et al.* CD8(+)-T-cell depletion ameliorates circulatory shock in Plasmodium berghei-infected mice. *Infect Immun.* 2001 Dec;69(12):7341-8.
- [127] Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature.* 2002 Aug 15;418(6899):785-9.
- [128] Senaldi G, Vesin C, Chang R, Grau GE, Pigué PF. Role of polymorphonuclear neutrophil leukocytes and their integrin CD11a (LFA-1) in the pathogenesis of severe murine malaria. *Infect Immun.* 1994 Apr;62(4):1144-9.
- [129] Van den Steen PE, Geurts N, Deroost K, *et al.* Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 May 1;181(9):957-68.

- [130] Kaner RJ, Ladetto JV, Singh R, Fukuda N, Matthay MA, Crystal RG. Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000 Jun;22(6):657-64.
- [131] Connolly DT. Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem.* 1991 Nov;47(3):219-23.
- [132] Zebrowski BK, Yano S, Liu W, *et al.* Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res.* 1999 Nov;5(11):3364-8.
- [133] Papaioannou AI, Kostikas K, Kollia P, Gourgoulisanis KI. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res.* 2006;7:128.
- [134] Thickett DR, Armstrong L, Christie SJ, Millar AB. Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Nov 1;164(9):1601-5.
- [135] Duarte MI, Corbett CE, Boulos M, Amato Neto V. Ultrastructure of the lung in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1985 Jan;34(1):31-5.
- [136] Taylor WR, White NJ. Malaria and the lung. *Clin Chest Med.* 2002 Jun;23(2):457-68.
- [137] Charoenpan P, Indraprasit S, Kiatboonsri S, Suvachittanont O, Tanomsup S. Pulmonary edema in severe falciparum malaria. Hemodynamic study and clinicophysiological correlation. *Chest.* 1990 May;97(5):1190-7.
- [138] Borrill ZL, Starkey RC, Singh SD. Variability of exhaled breath condensate leukotriene B4 and 8-isoprostane in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2007;2(1):71-6.
- [139] Epton MJ, Dawson RD, Brooks WM, *et al.* The effect of ambient air pollution on respiratory health of school children: a panel study. *Environ Health.* 2008;7:16.
- [140] Liu L, Poon R, Chen L, *et al.* Acute effects of air pollution on pulmonary function, airway inflammation, and oxidative stress in asthmatic children. *Environ Health Perspect.* 2009 Apr;117(4):668-74.
- [141] Silver R. Lung Fibrosis in Systemic Sclerosis. *Scleroderma Voice.* 2004( Issue 1).
- [142] Anglim PP, Alonzo TA, Laird-Offringa IA. DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Mol Cancer.* 2008;7:81.
- [143] Wardlaw AJ, Hay H, Cromwell O, Collins JV, Kay AB. Leukotrienes, LTC4 and LTB4, in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 1989 Jul;84(1):19-26.
- [144] Caramori G, Pandit A, Papi A. Is there a difference between chronic airway inflammation in chronic severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005 Feb;5(1):77-83.
- [145] Barnes PJ. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003 Dec;14(6):511-22.
- [146] Cianchetti S, Bacci E, Ruocco L, *et al.* Granulocyte markers in hypertonic and isotonic saline-induced sputum of asthmatic subjects. *Eur Respir J.* 2004 Dec;24(6):1018-24.
- [147] Corradi M, Pignatti P, Manini P, *et al.* Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J.* 2004 Dec;24(6):1011-7.
- [148] Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, *et al.* Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J.* 2005 Sep;26(3):523-48.
- [149] Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Jul;110(1):28-34.
- [150] Rosias PP, Dompeling E, Hendriks HJ, Heijmans JW, Donckerwolcke RA, Jobsis Q. Exhaled breath condensate in children: pearls and pitfalls. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004 Feb;15(1):4-19.
- [151] Griese M, Latzin P, Beck J. A noninvasive method to collect nasally exhaled air condensate in humans of all ages. *Eur J Clin Invest.* 2001 Oct;31(10):915-20.
- [152] Robroeks CM, Jobsis Q, Damoiseaux JG, *et al.* Cytokines in exhaled breath condensate of children with asthma and cystic fibrosis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006 Feb;96(2):349-55.
- [153] Rosias PP, Robroeks CM, van de Kant KD, *et al.* Feasibility of a new method to collect exhaled breath condensate in pre-school children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010 Feb;21(1 Pt 2):e235-44.
- [154] Sack U, Scheibe R, Wotzel M, *et al.* Multiplex analysis of cytokines in exhaled breath condensate. *Cytometry A.* 2006 Mar;69(3):169-72.
- [155] Syslova K, Kacer P, Vilhanova B, *et al.* Determination of cysteinyl leukotrienes in exhaled breath condensate: method combining immunoseparation with LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011 Aug 1;879(23):2220-8.
- [156] Larstad M, Soderling AS, Caidahl K, Olin AC. Selective quantification of free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensate in asthma using gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Nitric Oxide.* 2005 Sep;13(2):134-44.

- [157] Czebe K, Barta I, Antus B, Valyon M, Horvath I, Kullmann T. Influence of condensing equipment and temperature on exhaled breath condensate pH, total protein and leukotriene concentrations. *Respir Med.* 2008 May;102(5):720-5.
- [158] Ko FW, Leung TF, Wong GW, *et al.* Measurement of tumor necrosis factor-alpha, leukotriene B4, and interleukin 8 in the exhaled breath condensate in patients with acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2009;4:79-86.
- [159] Lex C, Zacharasiewicz A, Payne DN, *et al.* Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study. *Respir Res.* 2006;7:63.
- [160] Montuschi P, Barnes PJ, Ciabattoni G. Measurement of 8-isoprostane in exhaled breath condensate. *Methods Mol Biol.* 2010;594:73-84.
- [161] Svensson S, Olin AC, Larstad M, Ljungkvist G, Toren K. Determination of hydrogen peroxide in exhaled breath condensate by flow injection analysis with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2004 Oct 5;809(2):199-203.
- [162] Andreoli R, Manini P, Corradi M, Mutti A, Niessen WM. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17(7):637-45.
- [163] Corradi M, Folesani G, Andreoli R, *et al.* Aldehydes and glutathione in exhaled breath condensate of children with asthma exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Feb 1;167(3):395-9.
- [164] Gessner C, Scheibe R, Wotzel M, *et al.* Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 2005 Oct;99(10):1229-40.
- [165] Goldoni M, Catalani S, De Palma G, *et al.* Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect.* 2004 Sep;112(13):1293-8.

## 2.4. Réponse inflammatoire exacerbée

Le rôle majeur d'une réponse inflammatoire lors d'une maladie est le recrutement de cellules immunitaires comme les leucocytes, les monocytes/macrophages et les neutrophiles sur le site de l'infection. Ce recrutement est engagé grâce à un groupe de cytokines chimio-attractantes relarguées au cours de la phase aigüe, les chimiokines. Les chimiokines sont produites par de nombreux types cellulaires comme les lymphocytes et les monocytes qui vont produire en retour diverses cytokines [38, 39]. La fonction unique d'une cytokine sur un type cellulaire particulier est liée aux voies de signalisation qu'elle active et aux interactions entre ces diverses voies. La réponse pro-inflammatoire provenant des cellules de l'immunité innée et des cellules T est essentielle au contrôle de l'infection palustre [40, 41].

*P.falciparum* (ainsi que *P.vivax*) induit une réponse immunitaire spécifique chez l'hôte par la production de cytokines qui induisent à leur tour l'activation de macrophages, de lymphocytes T, de cellules Natural Killers (NK) et de neutrophiles en vue de lutter contre l'infection. La balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires engagées a un impact sur le niveau d'anémie, la charge parasitaire, le degré de sévérité clinique ainsi que sur le devenir de la maladie [42-46]. La principale réponse immunitaire protectrice mise en jeu lors d'un accès palustre est la production d'IFN- $\gamma$  via l'IL-12. L'IFN- $\gamma$  contrôle la parasitémie par activation des monocytes/macrophages pour induire la phagocytose et la sécrétion de médiateurs anti-plasmodiaux, dont le TNF- $\alpha$  et le NO [40]. De nombreuses études suggèrent un rôle du TNF- $\alpha$  dans la pathogénicité de la maladie du fait de son taux plasmatique plus élevé au cours d'un accès grave [47-52]. Le TNF- $\alpha$ , de par son rôle pro-inflammatoire, contribue à la réponse immunitaire mise en jeu au cours d'un accès palustre en induisant une fièvre, préjudiciable au développement parasitaire, et/ou en stimulant des cellules effectrices [50]. Cependant, la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 est indispensable à la régulation de la production de TNF- $\alpha$  et à la prévention de conséquences pathologiques néfastes. Il a en effet été montré que l'évolution clinique du paludisme grave était sous la dépendance d'une balance cytokinique entre le TNF- $\alpha$  et l'IL-10 [47, 49, 52, 53]. Un autre marqueur important de l'inflammation impliqué dans l'activation de l'immunité cellulaire et de la phagocytose est la néoptérine (dérivé pyrazino-pyrimidique), qui est relarguée par les monocytes/macrophages préalablement activés par l'IFN- $\gamma$  [54, 55]. L'augmentation de néoptérine dans la circulation est associée à une augmentation de la sévérité de l'anémie au cours d'un accès palustre et à la persistance de l'anémie après traitement [56-59]. Bien qu'une hypothèse ait été faite pour expliquer le rôle de l'activation immunitaire et de l'inflammation dans le développement d'une détresse respiratoire au cours du paludisme grave [60, 61], elle n'a pas été directement explorée jusqu'à présent. De plus, le rôle que jouent les cytokines dans la réponse inflammatoire et qui

détermine l'évolution clinique, ainsi que la sévérité du paludisme, spécialement dans le développement d'une détresse respiratoire chez les enfants, reste à l'heure actuelle mal défini. Leur rôle dans la clairance parasitaire, l'activation immunitaire et la production de cytokines pro-inflammatoires doivent être régulés pour ne pas devenir délétères. En effet, une production excessive de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ , peuvent aussi directement contribuer à la sévérité de la maladie [41, 62]. La réponse immunitaire mise en jeu au cours d'un accès palustre est complexe et des zones d'ombre demeurent. De nombreuses études menées *in vitro* et sur modèle murin tentent de mieux comprendre les mécanismes immunologiques mis en jeu au cours d'un accès palustre.

*Objectifs*

## Objectifs

La majorité des informations portant sur les mécanismes inflammatoires au cours de l'accès palustre sont parcellaires, se limitant à la mesure de quelques médiateurs inflammatoires à la fois, uniquement au niveau de la circulation périphérique. Ceci ne permet pas d'appréhender les mécanismes impliqués lors du paludisme grave et ne reflète pas forcément ce qui se produit au sein d'un organe affecté comme le foie ou les poumons. De plus, la détresse respiratoire au cours d'un accès palustre a été peu investiguée jusqu'à présent, se limitant la plupart du temps à une étude physiologique de ce mécanisme chez l'homme [63-65]. Certains modèles murins tentent également d'étudier cette détresse respiratoire [66-68]. Cependant, l'aspect immunologique de la détresse respiratoire n'a jamais été exploré jusqu'à présent. Enfin, très peu d'études ont tenté d'évaluer l'évolution de la réponse inflammatoire au cours de l'accès palustre, se limitant à quelques paramètres au cours de l'accès palustre simple chez l'adulte.

En raison du manque d'informations sur ces différents points, nous avons souhaité rechercher des marqueurs pronostics de gravité lors de l'accès palustre, notamment lors du développement d'une atteinte pulmonaire. Cependant, devant le faible nombre de patients présentant une atteinte pulmonaire associée à un accès palustre, seule une tendance pour ces patients sera donnée à ce stade de l'étude. Nous avons également souhaité rechercher des marqueurs pronostic d'évolution de l'accès palustre après prise de traitement antipaludique. La comparaison des mécanismes inflammatoires mis en jeu au cours de l'accès palustre en fonction de la gravité de la maladie a été menée à travers deux approches combinées :

1. Une **approche immunologique** permettant de comparer la réponse inflammatoire mise en jeu selon le niveau de gravité de l'accès palustre, en comparant le taux de 17 médiateurs inflammatoires représentant aussi bien la réponse de type cellulaire qu'humorale, ainsi que la réponse Th17. Ce dosage a été effectué dans la circulation périphérique, mais également au niveau dans les alvéoles pulmonaires, avec évaluation de l'élimination de ces médiateurs dans les urines par méthode immuno-enzymatique en multiplex.
2. Une **approche transcriptomique** (puces à ADN), en conservant les mêmes patients afin d'affiner la compréhension de l'analyse immunologique et de rechercher des gènes à valeur pronostic dans la gravité de la maladie et dans son évolution.

*Epidemiologie*

-

*Cohorte*

# Epidémiologie

La République Démocratique du Congo (RDC) est dominée par trois faciès épidémiologiques (Figure 3) qui sont :

- Le faciès équatorial dans les régions de forêts et de savanes post forestières. Là, la transmission s'étale sur toute l'année.
- Le faciès tropical dans les régions de savanes humides : bien qu'à recrudescence saisonnière durant la saison des pluies (5 à 8 mois), la transmission s'étale aussi toute l'année à cause de l'abondance des cours d'eau.

Dans ces deux premiers faciès, les formes graves de paludisme, en particulier les formes neurologiques et anémiques, sont fréquentes. Ces deux faciès occupent 97% du territoire national et toute la population qui y habite est exposée à au paludisme.

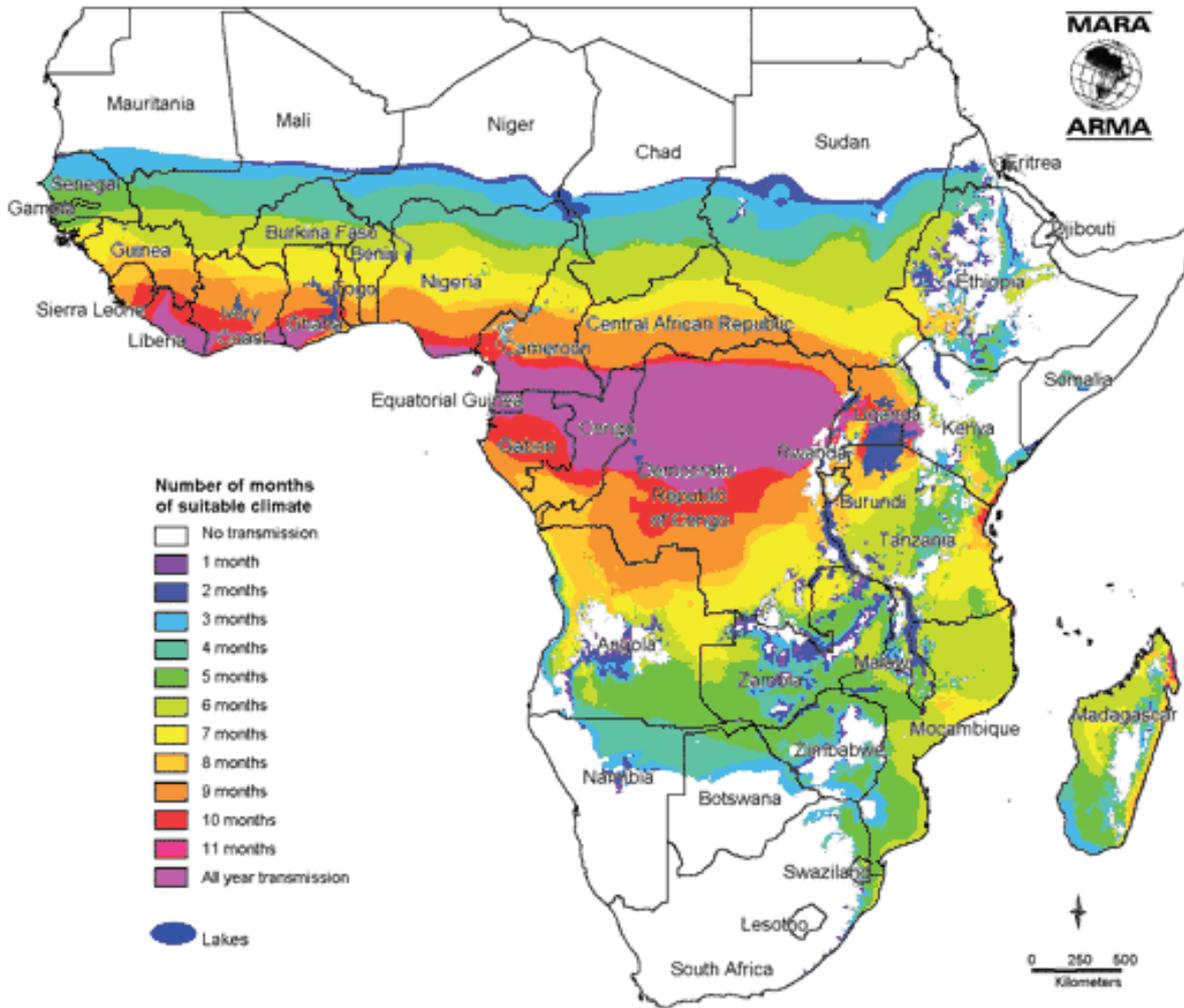
- Le faciès montagnard se rencontre dans les zones situées entre 1 000 et 1 500 mètres d'altitude, essentiellement situées à l'Est du pays. Dans ces zones, la période de transmission est très courte. Il peut même y avoir des années sans transmission. La prémunition est absente. Les formes graves de paludisme s'observent donc dans l'ensemble de la population, adulte et enfant. Le paludisme s'exprime sous forme de recrudescences aiguës annuelles (aspect pseudo épidémique).

Les espèces plasmodiales rencontrées en RDC sont *P. falciparum*, responsable des formes graves du paludisme et qui demeure l'espèce la plus fréquente (95%), suivi de *P. ovale* et le *P. malariae*. Ces deux dernières espèces peuvent se trouver séparément ou en infections mixtes avec *P. falciparum*.

La politique nationale de la lutte contre le paludisme se conforme aux directives de l'OMS.

On retrouve parmi les mesures préventives l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide distribuées lors des campagnes de masse à la population générale et lors des consultations prénatales et pré-scolaires respectivement aux femmes enceintes et aux enfants de moins d'un an. Le traitement préventif et intermittent de la femme enceinte est la sulfadoxine-pyriméthamine. Des pulvérisations intra domiciliaires d'insecticides à effet rémanent sont également réalisées.

La prise en charge des cas de paludisme s'effectue par diagnostic clinique avec confirmation à l'aide d'un test de diagnostic rapide (TDR) et de la microscopie (frottis sanguin et goutte épaisse). Les accès palustres simples sont traités avec la combinaison artésunate + amodiaquine préférentiellement. L'artémether-luméfantine peut être utilisé en cas de contre-indication ou d'allergie à la combinaison artésunate + amodiaquine ou encore dans le secteur privé. En cas



**Figure 3.** *Durée de transmission saisonnière du paludisme (Mara/Arma, 2001).*  
 Dans l'ensemble, le paludisme reste la première cause de morbidité et de mortalité et les faciès épidémiologiques restent encore à l'image de cette carte.

d'échec thérapeutique, de la quinine en comprimé est associé à la clindamycine. Les accès palustres graves sont traités par de la quinine en perfusion (dose de charge).

Avec le Nigéria, la RDC totalisait près de 40% des décès imputés au paludisme, principalement des enfants de moins de 5 ans en 2010 [1].

Le choix de la RDC pour répondre aux objectifs de cette thèse a été effectué en raison de l'aspect holoendémique du paludisme dans ce pays. Nous avons mené notre étude prospective longitudinale entre 2010 et 2012 au centre hospitalier Monkole, situé à Kinshasa, capitale de la RDC, en raison d'une structure hospitalière adéquate et d'un personnel médical compétent. Au cours de cette étude nous avons souhaité mieux caractériser la réponse inflammatoire en fonction de la gravité de l'accès palustre dans un premier temps dans le but de trouver des marqueurs pronostics.

# Résultats

## Approche immunologique

# Résultats

## 1. La modulation de la réponse cytokinique

Dans ce premier paragraphe, nous présentons brièvement les acteurs impliqués dans la mise en place d'une réponse immunologique à un pathogène. C'est au moment de la phase intra-érythrocytaire (présentée dans l'introduction générale) que les symptômes cliniques apparaissent. A ce stade, la réponse pro-inflammatoire médiée par les cellules de la réponse innée (cellules NK, cellules dendritiques, granulocytes, mastocytes) et les cellules T est essentielle au contrôle de l'infection palustre. En général, les mérozoïtes envahissent les érythrocytes au travers d'interactions récepteurs-ligands. La protéine *PfEMP-1* exprimée par le parasite permet aux hématies parasitées d'interagir avec des récepteurs de l'hôte comme CD36 or ICAM-1, présents à la surface de diverses cellules et d'induire la séquestration parasitaire [25]. En réponse aux antigènes parasitaires (*PfEMP-1*, *PfGPI* et l'hémozoïne) reconnus par des récepteurs de reconnaissance de motifs microbiens (PRRs) (ex: TLRs) ou des cytokines inflammatoires (ex: IFN- $\gamma$ ), les cellules dendritiques (CDs) et les monocytes/macrophages sont activés [25, 29, 69-71]. Ces deux types cellulaires vont produire une variété de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, et le TNF- $\alpha$ , impliquées dans l'apparition de la fièvre [72]. Ces cytokines vont augmenter le recrutement de monocytes/macrophages et de CDs, qui, une fois activés, vont synthétiser l'IL-8 qui va induire une migration de neutrophiles sur le site de l'inflammation. L'IL-12 libérée par les CDs activés va activer les cellules NK, cellules productrices d'IFN- $\gamma$ . Le NO libéré par les macrophages activés provoque la lyse des parasites [73]. D'ailleurs, il a été montré que le TNF- $\alpha$ , l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  sont induits précocement au cours de l'infection palustre [74-80]. Cette induction précoce joue un rôle majeur dans l'immunité protectrice et dans la clairance parasitaire [80-83].

En réponse à la sécrétion de ces cytokines, l'IL-10 et le facteur de croissance transformant (TGF- $\beta$ ), produits par les macrophages activés ou par les cellules T régulatrices, vont être sécrétés afin de les réguler. Ces cytokines anti-inflammatoires inhibent la prolifération des lymphocytes T auxiliaires de type 1 (Th1), préalablement activées par les CDs, cellules présentatrices d'antigène via leurs complexes majeurs d'histocompatibilité de classe 1 (CMH I). Les CDs possèdent également des CMH II, leur permettant d'interagir avec les cellules B au cours de la réponse humorale. L'inhibition des cellules Th1 par l'IL-10 va permettre une augmentation du taux circulant et/ou de la sécrétion de cytokines Th2 comme la cytokine anti-inflammatoire IL-4 et pro-inflammatoire IL-5, favorisant le développement de cellules Th2 et par conséquent celui de la réponse humorale [72]. Cette réponse humorale, médiée principalement par des IgG, nécessite une exposition à de multiples variant antigéniques du parasite [84, 85].

Dans la littérature, on peut retrouver des discordances par rapport à ce schéma immunologique. Ces discordances peuvent être dues aux différents laps de temps existant entre le jour où le patient a été infecté et le jour où il est incorporé dans l'étude. L'historique du patient vis-à-vis des accès palustres qu'il a pu avoir au cours de sa vie ainsi que vis-à-vis d'autres pathogènes peut également influencer sur la réponse immunologique induite. Il existe également une variabilité génétique inhérente à chaque individu et à chaque isolat plasmodial, qui peut jouer dans la modulation cette immunité.

Ces dernières années, le rôle initialement prépondérant joué par le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  a été relativisé. Wroczynska et *al.* ont montré un taux d'IFN- $\gamma$  inversement corrélé au nombre d'infections palustres auxquelles ont été soumis ces individus, alors que d'autres ne relèvent même pas de différences significatives entre le taux d'IFN- $\gamma$  des patients impaludés et celui des témoins [86-89]. Des taux très élevés ou persistant d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  peuvent également être délétères et entraîner des complications telles que des lésions dans différents organes (cerveau, poumons, rein, foie), une mauvaise régulation de la parasitémie ou encore une anémie sévère [48, 50, 90, 91].

Selon le nombre d'infection palustres dans la vie du patient et son niveau de gravité, différentes classes d'anticorps seront retrouvées. En effet, chez des patients infectés moins de 5 fois, on retrouve majoritairement des IgM, des IgA et des IgE, alors que chez des patients ayant fait plus de 5 accès palustres, on retrouve majoritairement des IgG1, IgG2 et IgG3. Les différents sous-types d'IgG (IgG1, IgG2 et IgG3) sont majoritairement présents lors d'un accès palustre simple. Lors d'un accès grave, les immunoglobulines IgG4, IgE et IgM sont prépondérantes [84].

Des études ont tenté de comprendre les raisons et les conséquences des variations de sécrétions de cytokines entre patients présentant un accès palustre simple et ceux présentant un accès palustre grave. Lors de l'accès palustre grave, les taux d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  et IL-10 sont généralement retrouvés plus élevés, notamment lors d'atteintes cérébrales, alors que l'IL-12 est inversement corrélée au niveau de gravité de la maladie [89, 92]. Perera et *al.* ont montré dans leur étude que les patients présentant un accès grave sécrètent en majorité du TNF- $\alpha$  de type allélique TNF2 avec un ratio TNF- $\alpha$ /IL-10 augmenté tandis que ceux présentant un accès simple sécrètent en majorité du TNF- $\alpha$  de type allélique TNF1, laissant à penser que la différence allélique du TNF- $\alpha$  peut avoir un impact dans la sécrétion d'IL-10 et dans la sévérité de la maladie [92]. D'ailleurs, plus que le taux isolé de TNF- $\alpha$ , le ratio TNF- $\alpha$ /IL-10, reflétant la balance de la réponse cytokinique mise en jeu, a également été impliqué dans la gravité de la maladie

[93]. Dans une étude menée chez la souris (*P. yoelii* 17X/C57BL/6), il a été mentionné qu'une production trop précoce d'IL-10 pouvait aussi être associée à une plus grande susceptibilité à l'infection palustre [94]. Chez les enfants par contre, l'IL-12, alors qu'il semble inversement corrélé à la gravité de la maladie dans certaines études, est retrouvé plus élevé dans les autres [51, 95, 96].

L'évolution de certaines cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 et IL-4) au cours du suivi de patients a été analysée dans quelques études. On en dénombre environ une dizaine sur les vingt dernières années (adultes et enfants confondus).

Il semble que la concentration de TNF- $\alpha$  diminue progressivement (sur 8 jours) jusqu'à son niveau basal [88], contrairement au taux d'IFN- $\gamma$ , qui lorsqu'il est augmenté, revient rapidement à la normale (1 à 3 jours) [86, 87]. En effet, Ringwald et *al.* ne relèvent aucune augmentation significative de d'IFN- $\gamma$ , et ce taux reste stable durant le suivi du patient [88]. L'IL-12, autre cytokine pro-inflammatoire, a été retrouvée élevée pendant les 3 jours dans l'étude de Torre et *al.* [82]. Nous n'avons trouvé dans les études de suivi qu'une seule cytokine anti-inflammatoire, l'IL-4, dont le taux augmente entre J0 et J3 [82, 97].

Ce schéma général n'est pas retrouvé dans les études de suivi d'enfants impaludés. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  restent élevés entre J0 et J8, tandis que l'IFN- $\gamma$ , l'IL-6 et l'IL-10, baissent. De plus, la présence d'IL-10 est positivement corrélée avec la densité parasitaire [98-100]. Des fluctuations ont été montrées pour l'IL-12, l'IL-13, l'IL-18 et IL-1 $\beta$ , entre le J0 et le J3 [99].

Des chimiokines (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-3 $\alpha$ , MIG et CXCL16), ont également été mesurées chez les enfants. Toutes ces chimiokines, élevées à J0, diminuent rapidement (2-3 jours) et MIP-3 $\alpha$ , MIG et CXCL16 semblent corrélés à la densité parasitaire [101, 102].

Les analyses cytokiniques menées dans ces études n'ont permis de mettre en évidence aucune signature moléculaire particulière associée à la protection ou à la sévérité du paludisme [103, 104]. Nous avons mis en place une étude prospective longitudinale chez des patients infectés par *P. falciparum* en zone d'holoendémie afin d'évaluer la réponse induite chez ces patients et la modulation de celle-ci en fonction de la gravité de l'accès palustre et lors d'un suivi, 7 et 30 jours après le début du traitement.

### 1.1. Sujets et méthodes

Cette étude prospective de cohorte avait pour but la recherche de marqueurs pronostics de gravité et d'évolution par une meilleure compréhension de la réponse inflammatoire mise en

place au cours du paludisme simple par rapport au paludisme grave, avec une attention plus particulière au cours du développement d'une atteinte pulmonaire.

### **Sujets**

Au total, 145 patients âgées de plus de 12 ans ont été recrutés au cours de cette étude. Ces patients ont été classés en fonction des caractéristiques suivantes en cinq groupes : (1) un groupe d'individus sains (Témoins (T)) recrutés à l'hôpital Monkole parmi les patients présents pour leur visite médicale annuelle du travail (comme décrit précédemment [105, 106]); (2) un groupe de patients présentant un accès simple à *P. falciparum* (AS), d'après les critères de l'OMS (« Revue » Tableau 2) ; (3) un groupe présentant un paludisme grave (AG) (sujet avec  $\geq 1$  signe de gravité selon les critères de l'OMS); (4) un groupe de patients impaludés présentant une atteinte pulmonaire associée sans autre symptôme de gravité (AP); et (5) un groupe de patients présentant une infection pulmonaire sans infection palustre (P).

L'étude a été expliquée en français par un personnel de santé local et, lorsque cela était nécessaire dans la langue locale principale, le Lingala. Les personnes acceptant de participer à l'étude ont reçus une lettre d'information et ont signé un formulaire de consentement.

Hormis les individus appartenant au groupe contrôle qui n'ont été examinés qu'au jour d'incorporation (J0), tous les autres patients ont été revus à J7 et J30. A chaque visite, un examen standardisé a été effectué, avec évaluation des symptômes cliniques et dosage de diverses constantes biologiques comme le taux d'hémoglobine, l'évaluation de la parasitémie ou encore les fonctions physiologiques pulmonaires, à travers un EFR et un prélèvement de condensats.

Chaque examen était accompagné d'un questionnaire concernant les événements pouvant survenir entre les visites à J7 et J30.

Chaque visite incluait également un questionnaire avec des informations relatives à la toux que pouvait présenter le patient, des signes et des symptômes respiratoires éventuels, son tabagisme, le nombre d'épisodes fébriles au cours des derniers mois et la date des premiers symptômes de l'épisode actuel. La concentration en hémoglobine, l'hématocrite, la glycémie et le nombre de globules blancs ont été mesurés à l'aide d'un ABX micro 60 (Horiba, France). Un TDR a été utilisé pour la détermination de l'infection palustre sur sang total et un frottis sanguin par coloration au Giemsa a permis la détermination de la parasitémie. Le traitement antipaludique était composé de quinine (500 mg.) ou d'artéméther- luméfantrine pendant sept jours par voie orale (pour les accès simples) ou par une dose de charge de quinine (1 g.) en intraveineuse suivie de 7 jours de quinine en voie orale, selon les recommandations du ministère de la santé du pays.

Parmi les sujets témoins, la fréquence respiratoire et la saturation en oxygène mesurées ont été utilisées comme valeurs seuils par rapport à celles mesurées chez les malades. La fonction pulmonaire a également été mesurée à l'aide d'un spiromètre. Le débit expiratoire moyen

(DEM<sub>25-75</sub>), le volume expiré maximal au cours de la première seconde (VEMS), et la capacité vitale forcée (CVF) ont été mesurés.

Après analyse des fiches cliniques des patients et examens complémentaires en vue d'écartier des infections concomitantes, 94 patients ont été sélectionnés à partir des 145 patients initialement recrutés, composé de 25 témoins, 44 patients avec accès simples, 10 patients avec accès graves, 4 patients avec accès palustre associé à une atteinte pulmonaire et 11 patients avec pneumopathie sans atteinte palustre.

### ***Récolte des condensats pulmonaires (EBC)***

Les condensats sont collectés à l'aide d'un condenseur d'air EcoScreen Turbo® (Jaeger, Würzburg, Allemagne). Chaque patient a reçu comme instruction de respirer normalement par la bouche pendant 10 minutes (récupération de 1-2 ml), avec un clip sur le nez, et d'arrêter la collecte temporairement s'ils avaient besoin de cracher de la salive ou de tousser. Les condensats ont été collectés dans des tubes de polypropylène de type « low-bind » et aliquotés à raison de 300µl par tube et conservés jusqu'à leur analyse.

Le kit commercial Enz-Chek Ultra Amylase (Molecular Probes, Invitrogen, Oregon, USA) a permis de détecter la présence éventuelle d'α-amylase (sensibilité < 2mU/ml). Les échantillons contenant de la salive ont été exclus de toute analyse future.

### ***Recueil du plasma et du sang total***

Le sang du patient (5 ml) a été prélevé à l'aide d'un tube EDTA à l'admission, avant prise de tout traitement. Un aliquot (1 ml) de sang total a été réservé au diagnostic plasmodial par PCR. Après centrifugation, le plasma a été aliquoté dans des cryotubes et préservé jusqu'à analyse.

### ***Recueil du sérum***

Un autre échantillon sanguin a été collecté dans un tube sec. Ce tube a été gardé pendant 30 minutes à température ambiante (19-24°C), afin que le sang coagule. Le sérum a été ensuite aliquoté et préservé jusqu'à analyse.

### ***Recueil des urines***

Les urines sont collectées dans un tube stérile, aliquotées à raison de 5 ml et préservées à -80°C. Tous les échantillons ont été conservés à -80°C sur le site de prélèvement puis transférés à l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées à Marseille pour l'analyse par transport en carboglace.

### **Diagnostic moléculaire d'agent plasmodial**

L'ADN génomique total de chaque échantillon a été isolé avec le kit QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne), selon les recommandations du fabricant.

Tous les échantillons extraits ont été analysés par PCR en temps réel par l'utilisation du kit Taqman® Universal Master Mix (Applied Biosystems, France), dont la lecture a été effectuée sur un AB prism 7900HT (Applied Biosystems, France). Cette analyse a permis de confirmer 1) l'infection palustre à *P. falciparum* pour les patients impaludés ; 2) d'éliminer les éventuelles co-infections plasmodiales; et 3) l'absence d'infection plasmodiale pour les autres groupes. Pour ce diagnostic, nous avons utilisé les sondes 18S suivantes : la sonde plasprobe 5'-ACC GTC GTA ATC TTA ACC ATA AAC TAT GCC GAC TAG-3' dans un premier temps pour la détection de l'infection plasmodiale, puis les sondes falcprobe 5'-FAM-AGC AAT CTA AAA GTC ACC TCG AAA GAT GAC T-BHQ-3', vivaprobe 5'-HEX-AGC AAT CTA AGA ATA AAC TCC GAA GAG AAA ATT CT-BHQ-3', ovaprobe 5'-FAM-CGA AAG GAA TTT TCT TAT T-BHQ-3', malprobe 5'-HEX-CTA TCT AAA AGA AAC ACT CAT-BHQ-3' et knowprobe 5'-FAM-CTC TCC GGA GAT TAG AAC TCT TAG ATT GCT-BHQ-3', pour caractériser l'espèce. Le couple d'amorces utilisé était toujours le même : Plasmo1 comme amorce sens 5'-GTT AAG GGA GTG AAG ACG ATC AGA-3' et Plasmo2 comme amorce anti-sens 5'-AAC CCA AAG ACT TTG ATT TCT CAT AA-3' (Eurogentec, Angers, France) [107, 108].

### **Détermination de la concentration plasmatique de PfHRP2**

La concentration d'HRP2 (histidine-rich protein II) plasmodial (*PfHRP2*) a été dosée dans le plasma des patients impaludés en utilisant le kit MALARIA Ag CELISA (Cellabs, Australie), selon les recommandations du fournisseur.

Un pool de plasmas hyper-immuns (parasitémie > 200 000 parasites/ $\mu$ L) constitué à partir de plasmas de patients impaludés (Kinshasa, RDC), a été calibré à l'aide du témoin positif du kit MALARIA Ag CELISA titrant à 220 ng/mL de *PfHRP2*. Un pool de plasmas négatifs a été constitué à partir de plasmas d'individus sains (Kinshasa, RDC), préalablement vérifiés à l'aide d'un TDR (Palutop+4, All.Diag, Strasbourg, France) et confirmé par diagnostic PCR. Ceci a permis de comparer les résultats entre chaque analyse.

Le titrage de *PfHRP2* a été réalisé à l'aide d'une gamme diluée en série (1/16 au 1/2048) obtenue à partir du pool de plasmas hyper-immuns. Chaque échantillon a également été dilué en série, la concentration en *PfHRP2* étant très variable d'un individu à l'autre. Chaque dilution a été réalisée en duplicat.

La concentration de *PfHRP2* (ng/ml) pour chaque échantillon a ensuite été déterminée d'après l'équation de la courbe étalon obtenue à partir de la gamme. Le seuil de positivité, calculé à

partir du pool de plasmas négatifs (gamme de dilution du 1/2 au 1/64) a été établi par la moyenne des  $DO_{(450\text{ nm})} + 2$  écart-type.

### ***Taux de médiateurs inflammatoires***

Les médiateurs inflammatoires présents dans les échantillons de sérum, urine et condensat des différents groupes de patients ont été mesurés par un système basé sur la cytométrie en flux.

### ***Mesure des cytokines et chimiokines circulantes***

Les échantillons de sérum, urine et condensat des 94 patients sélectionnés (25 T, 44 AS, 10 AG, 11 P et 4 AP) ont été analysés. Dix-sept médiateurs inflammatoires circulants (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, MCP-1 et MIP-1 $\beta$ ) ont été mesurés simultanément à l'aide du kit commercial « Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex » (Bio-Rad Laboratories, France). Les standards et les anticorps, fournis dans le kit, ont été préparés selon les recommandations du fabricant. En résumé, les échantillons de sérum et d'urine ont été dilués au 1:4 avec respectivement le diluant du kit (sample diluent) ou du tampon phosphate salin avec 0,5% d'albumine de sérum bovin (PBS/BSA 0,5%). Les condensats ont été dosés purs. Une courbe étalon en huit points, diluée en cascade, a été préparée simultanément à partir de la solution mère de standards dans le diluant correspondant du kit (standard diluent) pour le sérum ou dans du PBS/BSA 0,5% pour les urines et les condensats. Cinquante microlitres d'échantillon dilué ou de standard ont été transférés sur une plaque 96 puits contenant des billes magnétiques sur lesquelles sont fixés les anticorps spécifiques de chaque médiateur dosé. La plaque a été mise à agiter pendant 30 secondes à 1100 rpm, puis réduite à 300 rpm, et incubée pendant 60 minutes à température ambiante. Après incubation et 3 lavages, l'anticorps de détection (1X) a été déposé sur la plaque pour une nouvelle incubation de 30 minutes, sous agitation. Après 3 lavages, la streptavidine couplée à la phycoérythrine (1X) a été déposée sur la plaque pour une incubation de 10 minutes, sous agitation. Les billes ont été remises en suspension avant lecture avec le système Bio-Plex 200 (Bio-Rad, France). Le dosage a été réalisé en duplicat, selon les recommandations du fabricant. Les résultats ont été analysés avec le logiciel Bio-Plex Manager 4.0 après modélisation d'une courbe de régression logistique à 5 paramètres (5PL) (Bio-Rad, France), basé sur la méthode StatLIA (Brendan Scientific). A partir des courbes de régression obtenues pour chaque analyte, la concentration des échantillons correspondante a été déterminée. Les seuils de sensibilité du kit sont : IL-1 $\beta$   $\geq$  0.6 pg/ml, IL-2  $\geq$  1.6 pg/ml, IL-4  $\geq$  0.7 pg/ml, IL-5  $\geq$  0.6 pg/ml, IL-6  $\geq$  2.6 pg/ml, IL-7  $\geq$  1.1 pg/ml, IL-10  $\geq$  0.3 pg/ml, IL-12(p70)  $\geq$  3.5 pg/ml, IL-13  $\geq$  0.7 pg/ml, IL-17  $\geq$  3.3 pg/ml, G-CSF  $\geq$  1.7 pg/ml, GM-CSF

$\geq 2.2$  pg/ml, TNF- $\alpha \geq 6.0$  pg/ml, IFN- $\gamma \geq 6.4$  pg/ml, IL-8  $\geq 1.0$  pg/ml, MCP-1  $\geq 1.1$  pg/ml et MIP-1 $\beta \geq 2.4$  pg/ml.

Une valeur de zéro a été attribuée à toutes les valeurs en dessous du seuil de détection. L'IL-2 et le GM-CSF ont été exclus de l'interprétation car ces cytokines étaient pour la plupart des échantillons (112/121, 93% pour l'IL-2 et 104/121, 86% pour le GM-CSF) en dessous du seuil de détection.

#### Dosage des leucotriènes

Les leucotriènes ont été mesurés avec les kits Luminex LTB4 (leucotriènes B4) et Luminex cysLTs (cysteinyl leucotriènes), (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Ce dosage est basé sur un système de compétition entre les LTB4/CysLTs et leurs conjugués respectifs LTB4/CysLT couplés à la phycoérythrine (traceur LTB4/CysLTs), pour un nombre limité de sites de fixation sur les billes de détection. Le dosage a été réalisé en duplicat, selon les recommandations du fabricant. La lecture a été effectuée avec le système Bio-plex-200 system (Bio-Rad, France). Les résultats ont ensuite été analysés à l'aide du programme de Cayman basé sur le %B/B0 versus la concentration en log des standards, en utilisant une courbe de régression logistique à 4 paramètres. Les limites de détection sont 24 pg/ml et 15 pg/ml pour les LTB4 les cysLTs, respectivement. Les échantillons pour lesquels les concentrations étaient en dessous du seuil ont été remplacés par la valeur seuil de chaque analyte.

#### Dosage des IgE totaux

Les taux d'IgE totaux dans le plasma des patients ont été mesurés sur un Elecsys 2010 avec le kit « the Elecsys IgE total 2 » (Roche diagnostics, Meylan, France), à l'hôpital d'instruction des armées Laveran (Marseille, France). La calibration a été effectuée avec le kit « Elecsys IgE CalSet » et le contrôle qualité avec le kit « Elecsys PreciControl Universal 1 et 2 ». La gamme de mesure de l'appareil est calibrée de 0,100 à 2500 IU/ml (0.240-6000 ng/ml). Les plasmas sont dosés une première fois sans dilution préalable. Les échantillons avec des concentrations au-dessus du seuil de détection, ont été dilués avec le diluent universel Elecsys au 1:10.

#### Détermination d'IgE spécifiques dirigés contre Plasmodium falciparum (PfIgE)

Un extrait d'antigènes solubles totaux de *P. falciparum* a été préparé à partir d'une forme synchrone de deux souches de références (3D7 et W2), à 5% de parasitémie. Les hématies parasitées en stades âgés ont été séparées des hématies saines sur colonne VarioMACS (Miltenyi Biotech), poolées, lavées avec du milieu de culture incomplet et lysées par 3 cycles de

congélation-décongélation. Le culot parasitaire a été lavé et centrifugé deux fois avec du PBS (1x) à 200g pendant deux fois 5 minutes, afin d'éliminer les fragments membranaires. Le contenu a été stérilisé sur un filtre à 0.22 µm. Les protéines parasitaires ont été quantifiées au Nanodrop (LabTech). L'extrait parasitaire a ensuite été dilué dans du PBS (1x) stérile à une concentration finale de 5mg/ml. Les antigènes parasitaires ont été aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

Les PflgE ont été détectés par méthode ELISA pour chaque temps de prélèvement. Les plaques ELISA (96 puits, Maxisorp, Nunc, Roskilde Danemark) ont été coatées avec 50 µl/puits d'extrait protéique de *P. falciparum* dilué à 10 µg/ml dans du PBS (1x) puis mis à incuber à 4°C sur la nuit. La saturation a été ensuite réalisée avec une solution de BSA (1%)-PBS-Tween20 (200µl/puits) pendant 1 heure à 37°C. Le plasma, dilué au 1:5 dans une solution de BSA (0,5%)-PBS-Tween20, a été déposé en duplicat (50µl/puits) et incubé sur la nuit à température ambiante. Le signal des PflgE a été amplifié avec un second anticorps purifié anti-IgE (*Beckman Coulter France S.A, Villepinte, France*) dilué au 1:5000 et incubé pendant 3 heures à 37°C. Une solution d'anticorps polyclonal anti-IgG couplé à la peroxydase (H+L; 115-035-062; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) dilué au 1:5000 a ensuite été déposé sur la plaque avec une incubation d'1 heure à 37°C. La révélation a été effectuée avec une solution de TMB (KPL, Gaithersburg, USA) et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. La réaction a été stoppée par 25µl de soude 2N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

En parallèle des IgE humains (Merck Chemicals Ltd, Nottingham, UK) dilués en série de 250 à 0 ng/ml ont été coatés sur chaque plaque afin d'établir une courbe étalon.

La lecture des plaques a été réalisée à une densité optique de 450 nm. Les concentrations des IgE spécifiques ont été calculées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 4.0 en utilisant une courbe de régression logistique à 4 paramètres. Un pool de plasmas négatifs d'européens non immuns pour le paludisme a été utilisé pour déterminer le seuil de positivité. Ce seuil a été établi à 5,509 ng/ml en utilisant l'absorbance moyenne des contrôles négatifs + 2 écart-type.

#### Production et purification de PflTCTP recombinants et d'anticorps monoclonaux anti-PflTCTP

La protéine PflTCTP, homologue fonctionnel de l'HRF (Histamine Releasing Factor) a été produite et purifiée à l'institut Pasteur de Paris. Le gène de PflTCTP a été inséré dans le vecteur d'expression pET16b (Novagen) marqué avec une étiquette 6His en N-terminal. Pour l'expression protéique, le plasmide recombinant a été transformé dans des cellules BL21(DE3)pLysS. Les cultures ont été incubées pendant 3 heures, après induction de l'expression du gène par 1mM d'IPTG. Les protéines recombinantes ont été purifiées sur colonnes de haute affinité « TALON™ Metal Affinity Resin » pour la PflTCTP-6His. Les endotoxines ont été enlevées par traitement à froid de Triton X114 à 0.1% et passage sur gel de polymyxine-

agarose (Detoxi-Gel, Pierce). L'élimination des endotoxines (<5U/mg) a été confirmé par dosage par lysat d'amebocyte de limule (LAL) à chaque préparation. Les souris ont été immunisées une première fois avec 10µg/ml de protéine recombinante conjugué à de l'adjuvant de Freund, puis 3 fois de plus à 15 jours d'intervalle avec de l'adjuvant incomplet. La production d'anticorps polyclonaux a été testée par ELISA et les souris ayant la meilleure réponse ont été gardées pour la fusion. Les splénocytes ont été prélevés, isolés et fusionnés avec les cellules de myélome (5/1) avec du polyéthylène glycol selon les recommandations du fournisseur (Sigma). Les cellules fusionnées ont ensuite été diluées dans du milieu sélectif (azaserine-hypoxanthine) et distribuées dans des plaques 24 puits à raison de 10<sup>5</sup> cellules par puits. Après 10 jours de culture, une sélection des anticorps produits a été effectuée par ELISA. Les hybridomes positifs ont été clonés en dilution limite et les surnageant des clones en croissance ont été testés en ELISA après 12-15 jours. Les clones positifs ont été injectés dans des souris prétraitées au pristane, pour la production d'anticorps. Chaque souris a reçu 5 million de cellules et les ascites ont été collectés 15 jours après. Le meilleur couple d'anticorps primaire et secondaire a ensuite été sélectionné en ELISA.

### **Analyses statistiques**

Pour les analyses statistiques, le logiciel R, version 2.15.2 (R Core Team, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>) a été utilisé. Dans un premier temps, un test de normalité a été effectué sur toutes les données immunologiques afin de déterminer si les valeurs suivaient une loi de distribution normale ou non. Les valeurs ne suivant pas une loi normale, des tests non paramétriques ont été utilisés pour l'analyse des données : Kruskal-Wallis (nombre de groupes > 2) et Mann-Whitney (comparaison 2 groupes) pour lesquels sont donnés les *p*-value et un test de corrélation de Spearman sur le log des valeurs pour lequel le coefficient de corrélation « *r<sub>s</sub>* » est donné. Les résultats sont exprimés par leur médiane, accompagnée des valeurs correspondant à 25% et 75% du quantile respectivement. En absence de précision, la *p*-value indiquée corresponde au test de Mann-Whitney.

## **1.2. Résultats**

Afin d'évaluer la réponse immunitaire de patients Kinois envers une infection palustre à *P. falciparum*, les taux de cytokines Th1 (IL-2, IL-12, IFN-γ et TNF-α), Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13), Th17 (IL-6 et IL-17), de chimiokines (IL-8, MCP-1 et MIP-1β) et de facteurs de croissance (G-CSF et GM-CSF) ont été dosés. Ce dosage a été effectué dans les sérums, les condensats pulmonaires et les urines de 58 patients infectés par *P. falciparum*. Les résultats ont été comparés à ceux de 25 témoins kinois et de 11 patients présentant une pneumopathie. Leurs données démographiques, cliniques et biologiques sont rassemblées dans le tableau 1. Les

**Tableau 1. Données cliniques et paracliniques des patients**

Variables	Médiane (interquartiles)					p-value
	T	AS	AG	AP	P	
Age (ans)	26 (26-38,5)	26 (18-32)	20 (15-21)	23,5 (14,25-32,25)	25 (23,5-27)	0,014
Température axillaire (°C)	37 (36-38)	37 (37-39)	38 (36-38)	37,5 (37-38,25)	37 (37-37,5)	0,004
Tension artérielle (mmHg)	115,5/70,0 (107,0/70,0 - 128,5/70,0)	105,0/70,0 (100,0/70,0- 118,0/70,0)	100,0/70,0 (92,0/70,0- 120,0/70,0)	100,0/57,5 (92,5/57,5- 102,5-57,5)	100,0/62,0 (90,0/62,0- 119,25/62,0)	ns
Fréquence respiratoire (cycles/min)	20 (20-22)	23,5 (20,25,5)	27 (20-32)	24 (24-24)	24 (24-32)	0,013
SpO <sub>2</sub> (%)	98 (97-98)	98 (97-98)	98 (97-98)	97 (96,5-97,5)	98 (95,75-98)	ns
PfHRP2 (ng/ml)	-	279 (113-710)	2948 (1014-10992)	2267,5 (1073-7877,5)	-	0,001
Hémoglobine (g/dl)	12,5 (11,25-13,75)	12 (11-13)	11 (89,75-11,25)	10,5 (9,75-11,5)	12 (11-13,75)	0,044
Hématocrite (%)	39,5 (36-43,75)	36 (34-40,75)	31 (28,5-36,25)	32 (28,75-34,75)	40 (35-43)	0,008
Glycémie (mmol/L)	5 (3,75-6)	5 (4-6)	6 (6-7)	4 (4-5,5)	5 (4-5)	0,021
Globules blancs (/mm3)	4100 (3800-5800)	5350 (4525-5625)	6100 (6100-6100)	-	5300 (3950-8550)	ns
Neutrophiles	51,5 (40,75-58,5)	54 (48-63,5)	79 (79-79)	-	51,5 (47-57,25)	ns
Lymphocytes	46,5 (41-57,27)	40 (31,5-43)	17 (17-17)	-	48 (40-51,25)	ns
Macrophages	1 (0-1,25)	1 (0-7,5)	4 (4-4)	-	0 (0-1,75)	ns
Eosinophiles	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-1,0)	ns
Basophiles	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0 (0-0)	ns
urée	2 (2-5)	4 (3-4,5)	2 (2-2)	-	2 (1,75-4,25)	ns
créatinémie	99,5 (83,75-128,25)	95 (85,75-107)	-	-	104 (81,5-108,25)	ns
Bilirubine totale	6 (4-17)	18 (15,5-25,5)	-	-	8,5 (6-12,75)	ns
Bilirubine directe	2 (1-6)	5 (3,5-16,5)	-	-	1 (0,75-2,25)	ns

T : témoins

AS : accès simples

AG : accès graves

AP : accès palustre associée à une atteinte pulmonaire

P : pneumopathie

**Tableau 2. Concentration de PfHRP2 dans les patients impaludés**

PfHRP2 (ng/ml)	Médiane (25%-75% quantiles)		p-value
	AS	AG	
J0	336,8 (113,3-599,8)	2948,3 (1014,0-10993)	0,001
J7	0,0 (0,0-0,0)	47,0 (0,0-410,7)	0,006
J30	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	-

patients impaludés ont été traités par antipaludique, quinine ou dérivés d'artémisinine, à leur admission. Les patients impaludés ainsi que ceux présentant une pneumopathie seule ont été revus à J7 pour contrôler l'efficacité du traitement et l'évolution de la maladie, et à J30 afin d'évaluer les événements éventuels survenus depuis la dernière visite. Si aucun événement particulier n'a été signalé par le patient, celui-ci est prélevé à J30. Cet échantillon a été utilisé pour évaluer le retour à la normale du patient.

### ***Détermination de PfHRP2 lors de l'accès palustre***

Afin de vérifier la classification de nos patients impaludés en fonction des critères de gravité présenté, nous avons évalué le taux de la protéine PfHRP2 circulante dans le plasma des patients impaludés.

Le taux de PfHRP2 plasmatique diffère significativement entre les groupes de patients impaludés (Kruskal-Wallis,  $p = 0,001$ ) (Tableau 2). Le taux de PfHRP2 chez les accès simples (AS) (279 ng/ml, 25-75% quantile : 113-710 ng/ml) est plus faible que chez les accès graves (AG) (2948 ng/ml, 25-75% quantile : 1014-10992 ng/ml ;  $p < 0,001$ ) et les AP (2268 ng/ml, 25-75% quantile : 1073-7878 ng/ml ;  $p = 0,018$ ). Le taux de PfHRP2 apparait légèrement corrélé à MCP-1 ( $r_s = 0,40$ ), l'IL-6 ( $r_s = 0,49$ ) et l'IL-10 ( $r_s = 0,44$ ) (Tableau 6). Il n'est par contre corrélé à aucune donnée clinique (Annexe 1).

### ***Evaluation du taux de médiateurs inflammatoires circulants dans le sérum chez des patients sains, présentant un accès palustre, ou une pneumopathie à l'admission.***

Chez les patients infectés par *P. falciparum*, excepté pour l'IL-5 et l'IL-7, tous les médiateurs inflammatoires sont significativement plus élevés chez les AS, AP et/ou AG à leur admission par rapport aux témoins (T) (Tableau 3).

Chez les patients présentant une pneumopathie, excepté pour l'IL-10, l'IL-17, le TNF- $\alpha$ , MCP-1 et MIP-1 $\beta$ , tous les médiateurs inflammatoires sont significativement plus élevés chez les P à leur admission par rapport aux individus contrôles (Tableau 4).

### ***Taux des cytokines pro- et anti-inflammatoires chez les patients présentant un accès palustre simple, sévère et avec une atteinte pulmonaire associée.***

Aucune différence significative n'étant trouvée entre les groupes AG et AP pour tous les médiateurs inflammatoires, les différences d'expressions seront données par rapport au groupe AS.

Les cytokines Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-12 et TNF- $\alpha$ ), bien que différenciellement exprimées entre les patients impaludés et les témoins (K-W ;  $p < 0,001$  ;  $p < 0,001$  et  $p = 0,013$ , respectivement) ne le sont pas entre les différents groupes d'impaludés (AS, AG et AP) (Tableau 3). L'IFN- $\gamma$ , bien

**Tableau 3a. Valeurs des médiateurs inflammatoires des catégories de patients impaludés à l'admission**

Médiateurs inflammatoires	Patients à l'admission (médiane avec interquartiles en pg/ml)							
	T	p-value <sup>a</sup>	AS	p-value <sup>b</sup>	AG	p-value <sup>c</sup>	AP	p-value <sup>d</sup>
IL-1β	0,08 (0,03-0,23)	1,57E-04	0,36 (0,14-1,12)	1,90E-04	0,46 (0,20-0,94)	0,017	0,89 (0,49-2,25)	0,006
IL-4	0,10 (0,07-0,31)	0,001	0,49 (0,14-1,15)	0,001	0,77 (0,27-1,65)	0,006	1,30 (0,75-7,42)	0,008
IL-5	0,23 (0,12-0,75)	0,046	0,47 (0,27-0,83)	ns	0,61 (0,39-0,70)	ns	0,55 (0,38-7,42)	ns
IL-6	0,46 (0,10-1,10)	1,88E-08	4,36 (1,86-13,07)	2,76E-05	62,56 (19,71-99,67)	1,50E-05	87,80 (56,92-141,63)	0,002
IL-7	2,38 (1,51-2,84)	0,082	3,15 (149-4,51)	ns	3,85 (2,20-5,92)	ns	3,82 (2,65-5,34)	ns
IL-8	5,04 (3,43-6,40)	2,08E-05	9,91 (6,37-16,98)	4,02E-04	29,38 (11,78-43,46)	3,91E-06	16,96 (15,26-19,65)	0,001
IL-10	0,16 (0-0,51)	4,27E-13	23,93 (7,08-63,18)	9,83E-11	91,62 (48,06-156,85)	1,16E-05	197,96 (135,97-330,70)	0,002
IL-12(p70)	2,91 (0,83-4,73)	3,12E-04	5,98 (2,55-9,09)	0,001	14,30 (4,10-23,91)	0,002	11,17 (8,07-27,87)	0,019
IL-13	0,27 (0,10-0,73)	0,003	0,53 (0,2-1,75)	0,008	1,06 (0,58-1,81)	0,005	1,68 (0,91-2,62)	0,013
IL-17	0 (0-1,08)	0,083	0 (0-1,53)	ns	3,38 (1,07-14,53)	0,011	3,38 (0-23,12)	ns
IFN-γ	3,31 (0,03-16,09)	0,054	11,25 (0,65-29,02)	ns	17,55 (13,34-63,87)	0,019	19,42 (7,36-30,74)	ns
TNFα	1,20 (0,77-4,79)	0,013	4,54 (1,53-10,57)	0,008	5,61 (5,28-21,11)	0,006	7,38 (4,78-9,82)	0,041
G-CSF	2,47 (0,68-5,01)	0,010	2,84 (0,73-6,70)	ns	8,45 (4,70-10,42)	0,007	7,11 (5,83-9,00)	ns
MCP-1	7,14 (4,15-10,04)	8,83E-05	11,27 (7,37-23,08)	0,004	82,17 (52,05-208,25)	3,99E-05	41,12 (31,50-192,71)	0,014
MIP-1β	71,8 (50,21-164,50)	1,44E-06	173,82 (114,87-252,28)	0,001	363,22 (248,04-432,23)	1,27E-06	387,86 (244,88-675,46)	0,003

<sup>a</sup> Analyse des variances Kruskal-Wallis T vs AS vs AG vs AP

<sup>b</sup> Analyse Mann-Whitney AS J0 vs T

<sup>c</sup> Analyse Mann-Whitney AG J0 vs T

<sup>d</sup> Analyse Mann-Whitney AP J0 vs T

qu'élevé chez les AS (11,25 pg/ml, 25-75% quantile: 0,65-29,02 pg/ml) et les AP (19,42 pg/ml, 25-75% quantile: 7,36-30,74 pg/ml, n'est significatif que chez les AG (17,55 pg/ml, 25-75% quantile: 13,34-63,87 pg/ml ;  $p = 0,019$ ), en comparaison des témoins (Tableau 3).

L'IL-1 $\beta$ , l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  sont également plus élevées chez les P, comparé aux témoins ( $p < 0,001$  ;  $p = 0,001$  et  $p = 0,017$ , respectivement) (Tableau 4). Aucune différence significative ne ressort entre les P et les groupes d'impaludés (Tableau 5).

D'ailleurs, l'IL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,84$  et  $r_s = 0,73$ ), l'IL-12 ( $r_s = 0,77$  et  $r_s = 0,67$ ) et le TNF- $\alpha$  ( $r_s = 0,89$  et  $r_s = 0,92$ ) sont fortement corrélés avec l'IFN- $\gamma$  chez les patients impaludés et chez les P (Tableau 6 et 7).

Les cytokines Th2 dosées (IL-4, IL-10 et IL-13) sont significativement plus élevée chez les patients impaludés par rapport aux témoins (K-W ;  $p = 0,001$ ,  $p < 0,001$  et  $p = 0,003$ , respectivement) (Tableau 3). Cependant, seule l'IL-10 est différenciellement exprimées entre les différents groupes de patients impaludés. La cytokine anti-inflammatoire IL-10 est plus élevée chez les AG (91,62 pg/ml, 25-75% quartile: 48,06-156,85 pg/ml;  $p = 0,003$ ) et les AP (197,96 pg/ml, 25-75% quartile: 135,97-330,70 pg/ml;  $p = 0,003$ ), comparé aux AS (23,74 pg/ml, 25-75% quartile: 7,08-63,18 pg/ml) (Tableau 3).

Les cytokines Th2 (IL-4 et IL-13) sont également augmentées chez les P, en comparaison des témoins (Tableau 4). Elles ne sont pas différenciellement exprimées entre les différents groupes de malades (Tableau 5). Contrairement aux patients impaludés, l'IL-5 est légèrement mais significativement augmentée à J0 (0,75 pg/ml, 25-75% quantile: 0,63-1,80 pg/ml ;  $p = 0,006$ ) par rapport aux témoins (0,23 pg/ml, 25-75% quantile: 0,12 - 0,75 pg/ml) (Tableau 4). Le taux d'IL-5 n'est différent qu'avec le groupe des AS ( $p = 0,032$ ) (Tableau 5).

L'IL-4 corrèle fortement avec l'IFN- $\gamma$  ( $r_s = 0,88$  et  $r_s = 0,75$ ), l'IL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,83$  et  $r_s = 0,84$ ), le TNF- $\alpha$  ( $r_s = 0,83$  et  $r_s = 0,84$ ) et l'IL-12 ( $r_s = 0,80$  et  $0,73$ ) chez les patients impaludés et chez les P (Tableaux 6 et 7). L'IL-4 corrèle également avec l'IL-5 ( $r_s = 0,71$  et  $r_s = 0,60$ ) et l'IL-7 ( $r_s = 0,70$  et  $r_s = 0,77$ ) chez les patients impaludés et chez les P (Tableau 6 et 7). Cette cytokine corrèle aussi avec l'IL-10 ( $r_s = 0,74$ ) chez les P, ce qui n'est pas le cas chez les patients impaludés (Tableau 6 et 7).

Parmi les cytokines Th17 (IL-6 et IL-17), l'IL-6, en plus d'être différenciellement exprimée entre les patients impaludés et les témoins (K-W;  $p < 0,001$ ), l'est également entre les groupes d'impaludés (Tableau 3). L'IL-6 est plus élevée chez les AG (62,56 pg/ml, 25-75% quantile: 19,71-99,67 pg/ml;  $p < 0,001$ ) et les AP (87,80 pg/ml, 25-75% quantile: 56,92-141,63 pg/ml;  $p = 0,002$ ), en comparaison des AS (4,36 pg/ml, 25-75% quantile: 1,86-13,07 pg/ml). L'IL-17 est retrouvée significativement plus élevée uniquement chez les AG (3,38 pg/ml, 25-75% quantile :

Tableau 3b. Tests statistiques entre les groupes de patients impludés dans le temps.

Médiateurs inflammatoires	P-value (Test de Mann-Whitney)						
	AG J0 vs AS J0	AP J0 vs AG J0	AP J0 vs AS J0	AS J7 vs AS J0	AG J7 vs AG J0	AS J30 vs AS J0	AG J30 vs AG J0
IL-1 $\beta$	0,781	0,260	0,116	0,307	0,536	0,295	0,317
IL-4	0,416	0,604	0,201	0,203	0,758	0,243	0,317
IL-5	0,451	0,877	0,784	0,101	0,142	0,198	0,181
IL-6	4,18E-04	0,503	0,002	0,034	0,002	0,001	0,003
IL-7	0,246	0,877	0,352	0,003	0,071	0,053	0,699
IL-8	0,026	0,604	0,130	0,368	0,042	0,655	0,240
IL-10	0,003	0,330	0,003	2,09E-07	0,001	1,10E-05	0,001
IL-12(p70)	0,074	0,940	0,139	0,254	0,918	0,563	0,029
IL-13	0,318	0,825	0,298	0,036	0,142	0,359	0,438
IL-17	0,013	0,938	0,440	0,928	0,283	0,366	0,041
IFN- $\gamma$	0,140	0,503	0,647	0,213	0,470	0,274	0,298
TNFa	0,175	0,604	0,523	0,215	0,758	0,471	0,083
G-CSF	0,034	0,710	0,160	0,124	0,758	0,290	0,060
MCP-1	0,001	0,604	0,144	0,011	0,008	0,131	0,012
MIP-1 $\beta$	0,002	0,940	0,044	0,001	0,001	0,075	0,002

Tableau 4. Valeurs des médiateurs inflammatoires des patients présentant une pneumopathie

Médiateurs inflammatoires	Patients à l'admission (médiane avec interquartiles en pg/ml)					
	P J0	p-value <sup>a</sup>	P J7	p-value <sup>b</sup>	P J30	p-value <sup>c</sup>
IL-1 $\beta$	0,29 (0,29-1,20)	3,93E-04	0,36 (0,34-0,78)	0,002	0,64 (0,56-0,71)	-
IL-4	0,46 (0,34-2,01)	0,001	0,37 (0,22-0,56)	0,021	1,07 (0,87-1,28)	-
IL-5	0,75 (0,63-1,80)	0,006	0,80 (0,64-0,96)	0,011	1,30 (1,06-1,54)	-
IL-6	3,76 (1,50-9,90)	0,001	0,87 (0,78-2,41)	ns	1,19 (0,85-1,54)	-
IL-7	3,20 (2,25-11,09)	0,021	3,78 (2,15-5,57)	ns	5,04 (4,71-5,36)	-
IL-8	12,46 (7,33-17,27)	0,001	7,14 (5,92-8,27)	0,028	5,12 (4,66-5,59)	-
IL-10	0,1 (0,03-2,82)	ns	0,07 (2,15-5,57)	ns	0,26 (0,13-0,38)	-
IL-12(p70)	6,53 (4,52-15,32)	0,001	5,92 (5,10-9,23)	0,001	11,14 (9,47-12,81)	-
IL-13	0,96 (0,6-1,65)	0,002	1,43 (0,95-2,62)	0,001	0,89 (0,73-1,04)	-
IL-17	0,00 (0,00-7,77)	ns	0,00 (0,00-0,00)	ns	0,62 (0,31-0,93)	-
IFN- $\gamma$	13,07 (8,08-52,06)	0,017	14,00 (8,33-15,17)	ns	48,04 (42,32-53,75)	-
TNFa	2,90 (2,12-15,68)	ns	4,54 (3,60-5,17)	ns	14,09 (11,36-16,81)	-
G-CSF	6,07 (3,29-25,53)	0,010	3,96 (3,42-6,48)	ns	63,77 (59,33-68,20)	-
MCP-1	6,33 (4,42-15,50)	ns	4,66 (3,62-18,40)	ns	6,26 (6,03-6,48)	-
MIP-1 $\beta$	101,52 (76,96-124,31)	ns	139,59 (61,61-159,20)	ns	19,48 (18,21-20,76)	-

ns : non significatif

<sup>a</sup> : p-value P J0 vs T

<sup>b</sup> : p-value P J7 vs T

<sup>c</sup> : p-value P J30 vs T, non réalisée car nombre d'échantillons insuffisants

Tableau 5. Test de significativité entre les patients présentant une pneumopathie et les patients impludés

Médiateurs inflammatoires	P-value J0			P-value J7		P-value J30	
	P vs AS	P vs AG	P vs AP	P vs AS	P vs AG	P vs AS	P vs AG
IL-1 $\beta$	ns	0,879	ns	ns	ns	NA	NA
IL-4	ns	ns	ns	ns	ns	NA	NA
IL-5	0,032	ns	ns	ns	0,056	NA	NA
IL-6	ns	0,003	0,010	ns	ns	NA	NA
IL-7	ns	ns	ns	ns	0,016	NA	NA
IL-8	ns	ns	ns	ns	ns	NA	NA
IL-10	1,06E-05	2,60E-04	0,005	0,004	0,008	NA	NA
IL-12(p70)	ns	ns	ns	ns	ns	NA	NA
IL-13	ns	ns	ns	ns	ns	NA	NA
IL-17	ns	ns	ns	ns	ns	NA	NA
IFN- $\gamma$	ns	ns	ns	ns	0,005	NA	NA
TNFa	ns	ns	ns	ns	ns	NA	NA
G-CSF	0,026	ns	ns	ns	ns	NA	NA
MCP-1	ns	0,002	0,056	ns	ns	NA	NA
MIP-1 $\beta$	0,010	2,38E-05	0,003	ns	ns	NA	NA

NA : non applicable car pas assez de d'échantillons

ns : non significatif

1,07-14,53 pg/ml ;  $p = 0,011$ ), comparée aux témoins. Par contre, cette cytokine n'est pas différentiellement exprimée entre les AS, AP et T.

Chez les P, seul le taux d'IL-6 est augmenté à J0 (3,76 pg/ml, 25-75% quantile: 1,50 - 9,99 pg/ml ;  $p = 0,001$ ), comparé aux témoins (Tableau 4). Le taux d'IL-6 est plus élevé chez les AG ( $p = 0,003$ ) et les AP ( $p = 0,010$ ) que chez les P (Tableau 5).

L'IL-6, en plus de corrélérer avec P $\beta$ HRP2, corrèle également avec l'IL-10 ( $r_s = 0,84$ ), l'IL-12 ( $r_s = 0,56$ ), MCP-1 ( $r_s = 0,72$ ) et MIP-1 $\beta$  ( $r_s = 0,54$ ) chez les patients impaludés (Tableau 6). Chez les P, cette cytokine ne corrèle qu'avec l'IL-8 ( $r_s = 0,76$ ) (Tableau 7). Si on ne regarde que les AG et les AP, l'IL-17 corrèle avec l'IL-6 ( $r_s = 0,85$ ) et l'IL-4 ( $r_s = 0,88$ ) (Annexe 2).

Taux de chimiokines chez les patients présentant un accès palustre simple, sévère et avec une atteinte pulmonaire associée

Les chimiokines IL-8, MCP-1 et MIP-1 $\beta$  sont significativement plus élevées chez les patients impaludés par rapport aux témoins (K-W;  $p < 0,001$  pour les 3 chimiokines) mais aussi différentiellement exprimées entre les groupes de patients impaludés (Tableau 3). L'IL-8 est plus élevée chez les AG (29,38 pg/ml, 25-75% quartile: 11,78-43,46 pg/ml;  $p < 0,026$ ), en comparaison des AS (9,95 pg/ml, 25-75% quartile: 6,37-16,98 pg/ml). Bien que l'IL-8 apparaisse plus élevée chez les AP (16,96 pg/ml, 25-75% quartile: 15,26-19,65 pg/ml), comparé aux AS, cette différence n'est pas significative (Tableau 3).

Il en est de même pour MCP-1. Cette chimiokine est plus élevée chez les AG (82,17 pg/ml, 25-75% quartile: 52,05-208,25 pg/ml;  $p = 0,001$ ) et les AP (41,12 pg/ml, 25-75% quartile: 31,50-192,71 pg/ml ;  $p > 0,05$ ) par rapport aux AS (11,21 pg/ml, 25-75% quartile: 7,37-23,08 pg/ml), bien que cette différence ne soit pas significative entre le groupe AP et AS (Tableau 3b).

MIP-1 $\beta$ , est significativement plus élevé chez les AG (363,22 pg/ml, 25-75% quartile: 248,04-432,23 pg/ml;  $p = 0,002$ ) et les AP (387,86 pg/ml, 25-75% quartile: 244,88-675,46 pg/ml;  $p = 0,044$ ), comparé aux AS (174,81 pg/ml, 25-75% quartile: 114,87-252,28 pg/ml) (Tableau 3.b).

MIP-1 $\beta$  est corrélé à MCP-1 ( $r_s = 0,60$ ) et à l'IL-8 ( $r_s = 0,68$ ) (Tableau 6).

Chez les P, seule l'IL-8 est augmentée à J0 (12,46 pg/ml, 25-75% quantile: 7,33-17,27 pg/ml ;  $p = 0,001$ ) par rapport aux témoins (Tableau 4). Aucune différence significative ne ressort entre les P et les groupes de patients impaludés (Tableau 5).

L'IL-8 corrèle faiblement avec plusieurs médiateurs pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-1, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5 et IL-6) de par son rôle central dans la réponse inflammatoire chez les patients impaludés (Tableau 6). Par contre elle corrèle avec MIP-1 $\beta$  ( $r_s = 0,67$ ), et dans une moindre mesure avec MCP-1 ( $r_s = 0,40$ ) et la SpO $_2$  ( $r_s = 0,41$ ) (Tableau 6 et Annexe 1). Chez les P, l'IL-8 est plutôt corrélée à l'IL-6 ( $r_s = 0,76$ ), et négativement corrélée aux IgE totaux ( $r_s = -0,67$ ) et aux

**Tableau 6. Tests de corrélation sur le log des médianes des patients impaludés entre les médiateurs inflammatoires à l'admission avec la confiance de celle-ci (*p-value*).**

**Coefficients de corrélation (r<sub>s</sub>)**

	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	P/IgE	MCP-1	MIP-1 $\beta$	P/TCTP	TNF- $\alpha$	P/HRP2
G-CSF	NA	0,521	ns	0,484	0,576	ns	0,440	0,623	0,494	0,361	0,687	ns	ns	0,408	ns	ns	0,635	ns
IFN- $\gamma$	0,521	NA	ns	0,766	0,494	0,646	0,839	0,878	0,733	0,219	0,602	0,318	ns	0,365	ns	0,642	0,886	ns
IL-10	ns	ns	NA	0,373	ns	ns	ns	ns	ns	0,842	ns	ns	ns	0,593	0,496	ns	ns	0,441
IL-12	0,484	0,766	0,373	NA	0,762	0,745	0,793	0,796	0,806	0,563	0,754	0,320	ns	0,457	0,328	0,578	0,772	ns
IL-13	0,576	0,494	ns	0,762	NA	0,493	0,604	0,654	0,638	0,284	0,836	ns	ns	0,185	ns	ns	0,563	ns
IL-17	ns	0,646	ns	0,745	0,493	NA	0,690	0,688	0,574	0,512	0,478	0,386	ns	0,394	0,433	0,554	0,612	ns
IL-1b	0,440	0,839	ns	0,793	0,604	0,690	NA	0,825	0,764	0,401	0,579	0,336	ns	0,367	ns	0,624	0,757	ns
IL-4	0,623	0,878	ns	0,796	0,654	0,688	0,825	NA	0,708	0,393	0,705	0,334	ns	0,342	ns	0,651	0,828	ns
IL-5	0,494	0,733	ns	0,806	0,638	0,574	0,764	0,708	NA	0,314	0,738	0,309	ns	0,326	ns	ns	0,688	ns
IL-6	0,361	ns	0,842	0,563	0,284	0,512	0,401	0,393	0,314	NA	0,333	0,318	ns	0,720	0,542	ns	0,445	0,486
IL-7	0,687	0,602	ns	0,754	0,836	0,478	0,579	0,705	0,738	0,333	NA	ns	ns	0,329	ns	ns	0,649	ns
IL-8	0,132	0,318	ns	0,320	0,174	0,386	0,336	0,334	0,309	0,318	0,219	NA	ns	0,403	0,668	0,040	0,167	ns
P/IgE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	0,542	ns	ns
MCP-1	0,408	0,365	0,593	0,457	ns	0,394	0,367	0,342	0,326	0,720	0,329	0,403	ns	NA	0,608	ns	0,477	0,396
MIP-1 $\beta$	ns	ns	0,496	0,328	ns	0,433	ns	ns	ns	0,542	ns	0,668	ns	0,608	NA	ns	ns	ns
P/TCTP	ns	0,642	0,213	0,578	ns	0,554	0,624	0,651	0,333	0,292	0,298	0,040	0,542	0,274	0,073	NA	0,621	ns
TNF- $\alpha$	0,635	0,886	0,268	0,772	0,563	0,612	0,757	0,828	0,688	0,445	0,649	ns	ns	0,477	ns	0,621	NA	ns
P/HRP2	ns	ns	0,441	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,486	ns	ns	ns	0,396	ns	ns	ns	NA

**P-value**

	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	P/IgE	MCP-1	MIP-1 $\beta$	P/TCTP	TNF- $\alpha$	P/HRP2
G-CSF	NA	2,04E-04	ns	2,82E-04	6,41E-06	ns	9,73E-04	1,06E-06	3,05E-04	0,010	1,35E-08	ns	ns	0,002	ns	ns	4,26E-07	ns
IFN- $\gamma$	2,04E-04	NA	ns	5,32E-10	4,90E-04	3,66E-04	3,53E-13	1,11E-15	1,03E-08	ns	9,61E-06	0,031	ns	0,013	ns	4,12E-04	2,22E-16	ns
IL-10	ns	ns	NA	0,006	ns	ns	ns	ns	ns	1,73E-14	ns	ns	ns	2,93E-06	1,59E-04	ns	ns	0,001
IL-12	2,82E-04	5,32E-10	0,006	NA	3,33E-11	8,43E-06	1,53E-12	2,92E-12	1,71E-12	2,07E-05	7,03E-11	0,020	ns	5,81E-04	0,016	6,63E-04	2,11E-11	ns
IL-13	6,41E-06	4,90E-04	ns	3,33E-11	NA	0,009	1,32E-06	1,93E-07	6,39E-07	0,043	3,55E-15	ns	ns	0,180	ns	ns	1,37E-05	ns
IL-17	ns	3,66E-04	ns	8,43E-06	0,009	NA	6,90E-05	7,38E-05	1,76E-03	0,008	0,012	0,047	ns	0,042	0,024	0,040	7,02E-04	ns
IL-1b	9,73E-04	3,53E-13	ns	1,53E-12	1,32E-06	6,90E-05	NA	9,55E-14	1,11E-10	0,004	4,58E-06	0,013	ns	0,006	ns	1,35E-04	8,63E-11	ns
IL-4	1,06E-06	1,11E-15	ns	2,92E-12	1,93E-07	7,38E-05	9,55E-14	NA	1,24E-08	0,006	7,84E-09	0,017	ns	0,014	ns	9,90E-05	6,57E-14	ns
IL-5	3,05E-04	1,03E-08	ns	1,71E-12	6,39E-07	0,002	1,11E-10	1,24E-08	NA	0,032	9,91E-10	0,029	ns	0,021	ns	ns	4,83E-08	ns
IL-6	0,010	ns	1,73E-14	2,07E-05	0,043	0,008	0,004	0,006	0,032	NA	0,017	0,023	ns	2,60E-09	3,97E-05	ns	0,001	3,42E-04
IL-7	1,35E-08	9,61E-06	ns	7,03E-11	3,55E-15	0,012	4,58E-06	7,84E-09	9,91E-10	0,017	NA	ns	ns	0,015	ns	ns	1,96E-07	ns
IL-8	ns	0,031	ns	1,95E-02	ns	0,047	0,013	0,017	0,029	0,023	ns	NA	ns	0,002	3,51E-08	ns	ns	ns
P/IgE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,023	ns	ns	NA	ns	ns	0,005	ns	ns
MCP-1	0,002	0,013	2,93E-06	5,81E-04	ns	0,042	0,006	0,014	0,021	2,60E-09	0,015	0,002	ns	NA	1,10E-06	ns	3,55E-04	0,003
MIP-1 $\beta$	ns	ns	1,59E-04	0,016	ns	0,024	ns	ns	ns	3,97E-05	ns	3,51E-08	ns	1,10E-06	NA	ns	ns	ns
P/TCTP	ns	4,12E-04	2,51E-01	6,63E-04	ns	0,040	1,35E-04	9,90E-05	ns	ns	ns	ns	0,005	0,129	ns	NA	1,94E-04	ns
TNF- $\alpha$	4,26E-07	2,22E-16	0,058	2,11E-11	1,37E-05	7,02E-04	8,63E-11	6,57E-14	4,83E-08	0,001	1,96E-07	ns	ns	3,55E-04	ns	1,94E-04	NA	ns
P/HRP2	ns	ns	0,001	ns	ns	ns	ns	3,42E-04	ns	ns	ns	ns	ns	0,003	ns	ns	ns	ns

NA : non applicable

ns : non significatif

éosinophiles ( $r_s = -0,83$ ) (Annexe 3). Il n'y a aucune corrélation entre MIP-1 $\beta$ , MCP-1 et les autres médiateurs inflammatoires chez les P (Tableau 7).

Taux des facteurs de croissance chez les patients présentant un accès palustre simple, sévère et avec une atteinte pulmonaire associée

Alors que les taux de GM-CSF ne sont pas détectés dans la plupart des échantillons, le taux de G-CSF est significativement plus élevé chez les AG (8,45 pg/ml, 25-75% quartile: 4,70-10,42 pg/ml) (K-W ;  $p = 0,010$ ). Malgré un plus fort taux de G-CSF également observé chez les AP (7,11 pg/ml, 25-75% quartile: 5,82-9,00 pg/ml), celui n'est pas différentiellement exprimé par rapport aux AS et T (Tableau 3b).

Chez les P, l'IL-7, facteur de croissance hématopoïétique et le G-CSF sont également augmentés à J0 (3,20 pg/ml, 25-75% quantile: 2,25 - 11,09 pg/ml ;  $p = 0,021$  et 6,07 pg/ml, 25-75% quantile: 3,29 - 25,53 pg/ml ;  $p = 0,010$ , respectivement) en comparaison des témoins (2,38 pg/ml, 25-75% quantile: 1,51 - 2,84 pg/ml et 2,47 pg/ml, 25-75% quantile: 0,68 - 5,01 pg/ml, respectivement) (Tableau 4). Le taux de G-CSF est plus élevé chez les P que chez les AS ( $p = 0,026$ ) (Tableau 5).

L'IL-7 et le G-CSF sont d'ailleurs corrélés chez les P ( $r_s = 0,65$ ) (Tableau 7). L'IL-7 corrèle également avec l'IL-10 ( $r_s = 0,81$ ) et l'IL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,85$ ) chez ces patients. Le G-CSF corrèle avec l'IL-10 ( $r_s = 0,80$ ), l'IL-12 ( $r_s = 0,70$ ), l'IL-1 $\beta$  ( $r_s = 0,69$ ), l'IL-5 ( $r_s = 0,79$ ) mais est inversement corrélé avec les éosinophiles ( $r_s = -0,78$ ) chez les P (Tableau 7 et annexe 3). Suivant le niveau de gravité du paludisme, le G-CSF ne corrèle pas avec les mêmes médiateurs inflammatoires. Il semble évoluer avec l'IL-13 ( $r_s = 0,71$ ) et l'IL-7 ( $r_s = 0,73$ ) chez les AS alors qu'il paraît davantage évoluer avec MCP-1 ( $r_s = 0,75$ ) chez les AG et AP (Annexes 2a et 2b).

***Evolution du taux de médiateurs inflammatoires circulants dans le sérum chez des patients sains, présentant un accès palustre, ou une pneumopathie à J7 et J30.***

A J7, les chimiokines (IL-8, MCP-1 et MIP-1 $\beta$ ) et les cytokines Th17 (IL-6 et IL-17) sont revenues à la normale chez les patients impaludés (Tableau 8).

Concernant les AP, nous ne donnerons qu'une tendance, l'effectif à J7 n'étant pas assez important pour faire des tests statistiques.

Bien que le taux d'IL-10 ait fortement réduit par rapport au jour d'admission chez les AS ( $p < 0,001$ ) et les AG ( $p = 0,001$ ), il reste encore significativement plus élevé chez ces patients (AS = 1,85 pg/ml, 25-75% quartile: 0,59-4,27 pg/ml  $p < 0,001$  et AG = 1,20 pg/ml, 25-75% quartile: 1,20-10,58 pg/ml ;  $p = 0,001$ ) par rapport aux témoins (0,16 pg/ml, 25-75% quartile: 0-0,51

**Tableau 7. Tests de corrélation sur le log des médianes des patients avec pneumopathie entre les médiateurs inflammatoires à l'admission avec la confiance de celle-ci (*p-value*).**

**Coefficients de corrélation ( $r_s$ )**

	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	PfIgE	MCP-1	MIP-1 $\beta$	PfTCTP	TNF- $\alpha$
G-CSF	NA	0,609	0,810	0,700	ns	ns	0,688	ns	0,791	ns	0,645	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IFN- $\gamma$	0,609	NA	ns	0,673	ns	ns	0,734	0,755	0,864	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,918
IL-10	0,810	ns	NA	0,738	ns	ns	0,898	0,738	ns	ns	0,810	ns	ns	ns	-0,381	ns	ns
IL-12	0,700	0,673	0,738	NA	ns	ns	0,798	0,727	0,800	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-13	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns						
IL-17	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-1b	0,688	0,734	0,898	0,798	ns	ns	NA	0,844	0,651	ns	0,853	ns	ns	ns	ns	ns	0,706
IL-4	ns	0,755	0,738	0,727	ns	ns	0,844	NA	0,600	ns	0,773	ns	ns	ns	ns	ns	0,836
IL-5	0,791	0,864	ns	0,800	ns	ns	0,651	0,600	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,682
IL-6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	0,755	ns	ns	ns	ns	ns
IL-7	0,645	ns	0,810	ns	ns	ns	0,853	0,773	ns	ns	NA	ns	ns	0,618	ns	ns	ns
IL-8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,755	ns	NA	ns	-0,673	ns	ns	ns
PfIgE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns
MCP-1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,673	ns	NA	ns	ns	ns
MIP-1 $\beta$	ns	ns	0,714	ns	0,618	ns	ns	ns	NA	ns	ns						
PfTCTP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns
TNF- $\alpha$	ns	0,918	ns	ns	ns	ns	0,706	0,836	0,682	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,436	NA

**P-value**

	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	PfIgE	MCP-1	MIP-1 $\beta$	PfTCTP	TNF- $\alpha$
G-CSF	NA	0,047	0,015	0,016	ns	ns	0,019	ns	0,004	ns	0,032	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IFN- $\gamma$	0,047	NA	ns	0,023	ns	ns	0,010	0,007	6,12E-04	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	6,66E-05
IL-10	0,015	ns	NA	0,037	ns	ns	0,002	0,037	ns	ns	0,015	ns	ns	0,047	ns	ns	ns
IL-12	0,016	0,023	0,037	NA	ns	ns	0,003	0,011	0,003	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-13	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-17	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-1b	0,019	0,010	0,007	0,003	ns	ns	NA	0,001	0,030	ns	0,001	ns	ns	ns	ns	ns	0,015
IL-4	ns	0,007	0,037	0,011	ns	ns	0,001	NA	0,051	ns	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	0,001
IL-5	0,004	6,12E-04	ns	0,003	ns	ns	0,030	0,051	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,021
IL-6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	0,007	ns	ns	ns	ns	ns
IL-7	0,032	ns	0,015	ns	ns	ns	0,001	0,005	ns	ns	NA	ns	ns	0,043	ns	ns	ns
IL-8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,007	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PfIgE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns
MCP-1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,023	ns	ns	ns	ns	ns
MIP-1 $\beta$	ns	ns	0,047	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,043	ns	NA	ns	ns	ns	ns
PfTCTP	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns
TNF- $\alpha$	ns	6,66E-05	ns	ns	ns	ns	0,015	0,001	0,021	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,180	NA

NA : non applicable

ns : non significatif

pg/ml) (Tableau 8). Il en est de même pour le taux d'IL-6, qui malgré une diminution significative chez les AS et les AG ( $p = 0,034$  et  $p = 0,002$ , respectivement), reste légèrement plus élevé à J7 chez les AS (2,33 pg/ml, 25–75% quartile: 0,18-5,27 pg/ml ;  $p = 0,040$ ) et AG (2,40 pg/ml, 25–75% quartile: 0,82-7,61 pg/ml ;  $p = 0,047$ ) par rapport aux témoins (0,46 pg/ml, 25–75% quartile: 0,10-1,10 pg/ml). Chez les AP, ces deux cytokines ont également diminuées, avec respectivement 9,43 pg/ml (25–75% quartile: 8,07-10,80 pg/ml) pour l'IL-10 et 1,91 pg/ml (25–75% quartile: 1,78-2,03 pg/ml) pour l'IL-6. Les cytokines Th1 (IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) demeurent toujours élevées à J7 chez les patients impaludés (Tableau 8). D'ailleurs les taux d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$ , ainsi que ceux d'IL-4 et d'IL-13 apparaissent plus élevés à J7 chez les AG et les AS, comparé à J0, bien que cette augmentation ne soit pas significative, hormis pour l'IL-13 chez les AS ( $p = 0,036$ ) (Tableau 8). Le taux de G-CSF reste également élevé à J7 chez les AG. Ce facteur de croissance a tendance à être plus élevé chez les AS à J7 par rapport à J0. Cependant, ces différences ne sont pas significatives.

Enfin, les taux d'IL-5 et d'IL-7, alors qu'ils n'étaient pas différents des témoins à J0, sont élevés à J7 (Tableau 8). L'IL-5 est légèrement, mais significativement plus élevée chez les AG (1,39 pg/ml, 25–75% quartile: 0,94-2,26 pg/ml  $p = 0,003$ ) et les AS (0,89 pg/ml, 25–75% quartile: 0,26-1,24 pg/ml  $p = 0,007$ ), comparé aux témoins (0,23 pg/ml, 25–75% quartile: 0,12-0,75 pg/ml) (Tableau 8a). L'IL-7 est également élevé à J7 chez les AG (7,07 pg/ml, 25–75% quartile: 5,16-12,02 pg/ml  $p < 0,001$ ) et les AS (7,11 pg/ml, 25–75% quartile: 2,54-8,92 pg/ml ;  $p = 0,001$ ) par rapport aux témoins. Cette cytokine est également significativement plus élevée qu'à J0 chez les AS ( $p = 0,003$ ) mais pas chez les AG, malgré une élévation similaire à celle des AS. La même tendance est observée chez les AP (Tableau 8).

Chez les P, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-6, l'IL-7 et le G-CSF sont revenus à la normale. L'IL-1 $\beta$ , l'IL-12, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IL-8 sont encore élevés à J7 (Tableau 4). L'IL-1  $\beta$ , l'IL-5 et l'IL-13 sont toujours aussi élevé qu'à J0 (Tableau 4). L'IL-13 à même légèrement augmenté par rapport à J0, de manière non significative (Tableau 4). L'IL-12, l'IL-4 et l'IL-8 bien qu'ayant diminué par rapport à J0, sont toujours élevées par rapport aux témoins (Tableau 4).

A J30, l'IL-8 reste élevée chez les AG et les AS, avec un taux similaire à celui dosé à J7, comparé aux témoins ( $p = 0,016$  et  $p = 0,037$ , respectivement). Les autres médiateurs inflammatoires sont revenus à la normale chez les AG (Tableau 9).

Chez les AS par contre, plusieurs médiateurs inflammatoires sont encore significativement élevés. L'IL-7, bien qu'ayant baissé par rapport à J7, demeure plus élevée que chez les témoins ( $p = 0,007$ ). L'IL-1 $\beta$ , IL-4 et l'IL-13 demeurent également légèrement plus élevées en comparaison des témoins ( $p = 0,004$  ;  $p = 0,005$  et  $p = 0,025$ , respectivement), avec des valeurs voisines de

**Tableau 8. Valeurs des médiateurs inflammatoires chez les patients impaludés à J7.**

Médiateurs inflammatoires	Patients à J7 (médiane avec interquartiles en pg/ml)					
	p-value <sup>a</sup>	AS	p-value <sup>b</sup>	AG	p-value <sup>c</sup>	AP
IL-1β	0,001	0,76 (0,15-1,32)	0,002	1,36 (0,28-1,66)	0,004	1,25 (0,97-1,52)
IL-4	0,001	1,38 (0,13-2,38)	0,004	1,48 (0,39-2,02)	0,001	2,04 (1,72-2,37)
IL-5	0,003	0,89 (0,26-1,24)	0,007	1,39 (0,94-2,26)	0,003	1,19 (0,87-1,50)
IL-6	ns	2,33 (0,18-5,27)	0,040	2,40 (0,82-7,61)	0,047	1,91 (1,78-2,03)
IL-7	2,88E-04	7,11 (2,54-8,91)	0,001	7,07 (5,16-12,02)	3,92E-04	8,26 (7,97-8,55)
IL-8	ns	10,72 (3,55-16,18)	ns	9,31 (5,97-17,01)	ns	10,86 (7,77-13,95)
IL-10	5,33E-05	1,85 (0,59-4,27)	3,79E-04	1,75 (1,20-10,58)	0,001	9,43 (8,07-10,80)
IL-12(p70)	0,003	9,76 (1,58-15,46)	0,007	10,35 (6,55-21,66)	0,006	10,95 (7,67-14,22)
IL-13	5,86E-05	2,87 (0,46-3,95)	0,001	3,02 (1,30-7,77)	0,001	4,03 (4,00-4,06)
IL-17	ns	0,00 (0,00-3,18)	ns	0,17 (0,00-5,17)	ns	0,00 (0,00-0,00)
IFN-γ	0,003	25,14 (0,89-46,52)	0,012	36,46 (29,74-58,50)	0,001	39,18 (27,09-51,27)
TNFα	0,003	8,38 (3,37-18,91)	0,002	14,30 (6,05-17,75)	0,004	9,05 (7,18-10,92)
G-CSF	ns	6,49 (3,02-11,38)	ns	8,75 (3,30-11,35)	ns	11,67 (9,46-13,87)
MCP-1	ns	6,08 (3,35-10,60)	ns	8,52 (7,22-10,72)	ns	5,21 (4,091-5,50)
MIP-1β	ns	92,71 (3,35-118,46)	ns	111,83 (95,11-145,47)	ns	129,68 (119,43-139,94)

<sup>a</sup> Analyse des variances Kruskal-Wallis T vs AS vs AG, pas assez de patients AP pour effectuer un test statistique

<sup>b</sup> Analyse Mann-Whitney AS J7 vs T

<sup>c</sup> Analyse Mann-Whitney AG J7 vs T

<sup>d</sup> Analyse Mann-Whitney AG J7 vs AS J7

**Tableau 9. Valeurs des médiateurs inflammatoires chez les patients impaludés à J30.**

Médiateurs inflammatoires	Patients à J30 (médiane avec interquartiles en pg/ml)					
	p-value <sup>a</sup>	AS	p-value <sup>b</sup>	AG	p-value <sup>c</sup>	AP
IL-1β	0,018	0,91 (0,22-1,65)	0,004	0,22 (0,07-0,44)	0,389	0,42 (0,32-0,52)
IL-4	0,015	1,12 (0,31-2,47)	0,005	0,16 (0,08-0,96)	0,374	0,54 (0,43-0,66)
IL-5	0,155	1,22 (0,30-1,57)	0,061	0,31 (0,21-0,39)	0,936	0,37 (0,25-0,48)
IL-6	0,156	1,01 (0,13-1,74)	0,722	0,00 (0,00-0,32)	0,143	0,00 (0,00-0,00)
IL-7	0,025	5,37 (2,93-8,98)	0,007	2,22 (2,03-4,36)	0,436	4,50 (3,78-5,21)
IL-8	0,053	10,89 (5,32-13,67)	0,037	12,34 (10,62-20,18)	0,016	12,26 (8,59-15,94)
IL-10	0,215	0,91 (0,10-1,28)	0,246	0,53 (0,48-1,95)	0,211	0,00 (0,00-0,00)
IL-12(p70)	0,079	9,01 (2,55-14,14)	0,036	2,17 (1,60-3,14)	0,936	4,05 (3,25-4,85)
IL-13	0,072	2,12 (0,26-3,38)	0,025	0,85 (0,43-1,26)	0,126	2,07 (1,29-2,85)
IL-17	0,851	0,00 (0,000-0,16)	0,736	0,00 (0,00-0,28)	0,802	0,00 (0,00-0,00)
IFN-γ	0,055	39,66 (4,67-58,15)	0,030	11,53 (1,21-18,24)	0,500	13,79 (10,69-16,89)
TNFα	0,115	10,89 (1,83-17,18)	0,063	2,42 (1,59-3,29)	0,536	2,53 (1,91-3,14)
G-CSF	0,112	6,04 (0,78-17,68)	0,266	0,75 (0,22-5,90)	0,809	4,20 (2,96-5,44)
MCP-1	0,315	7,83 (6,04-11,26)	0,337	5,74 (5,23-6,17)	0,514	3,41 (2,73-4,10)
MIP-1β	0,049	127,88 (82,14-149,98)	0,337	163,19 (161,44-171,02)	0,081	113,92 (92,87-134,98)

<sup>a</sup> Analyse des variances Kruskal-Wallis T vs AS vs AG, pas assez de patients AP pour effectuer un test statistique

<sup>b</sup> Analyse Mann-Whitney AS J30 vs T

<sup>c</sup> Analyse Mann-Whitney AG J30 vs T

<sup>d</sup> Analyse Mann-Whitney AP J30 vs T

celles dosées à J7. L'IL-12 reste également assez élevée, par rapport aux témoins ( $p = 0,036$ ), avec un taux équivalent au J7 (Tableau 9).

L'IFN- $\gamma$ , qui est toujours élevé par rapport aux témoins ( $p = 0,030$ ), est également plus élevé qu'à J0 et J7, bien que cette augmentation ne soit pas significative (Tableau 9).

Concernant les P, nous n'avons pas assez de patients revenus à J30 pour effectuer des tests statistiques. Cependant, il semblerait que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  aient augmenté à J30, par rapport à J0 et J7 (Tableau 4).

***Mesure de l'élimination de médiateurs inflammatoires chez des patients sains, présentant un accès palustre, ou une pneumopathie au cours du temps.***

Nous avons souhaité mesurer le taux de médiateurs inflammatoires présents dans les urines de nos patients afin d'évaluer leur élimination. Une grande partie des médiateurs inflammatoires dosés dans cette étude (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-17, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, G-CSF et GM-CSF) n'ont pas été détectés, ou détectés chez trop peu de patients pour être informatifs.

Chez les individus sains, on retrouve une élimination de l'IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1 et MIP-1 $\beta$ . Chez les patients, en plus de ces médiateurs, on retrouve également l'IL-6. L'IL-6 est retrouvée de façon significative dans les urines des différents groupes de patients impaludés (AG = 1,27 pg/ml  $p = 0,044$  ; AS = 0,95 pg/ml  $p = 0,001$  et AP = 2,46 pg/ml  $p = 0,019$ ) par rapport aux contrôles (0,00 pg/ml). L'IL-8, MCP-1 et MIP-1 $\beta$  sont également davantage retrouvés dans les urines des patients que chez les contrôles comme on peut le voir dans le tableau 10. Cependant, ce dosage ne permet pas vraiment de refléter l'élimination de ces médiateurs inflammatoires puisqu'il nous manque la diurèse et que les échantillons urinaires ont été récoltés une fois et non sur 24 heures. A J7 et J30, bien que l'on retrouve encore l'IL-8 et MCP-1 plus élevé chez les AG, ceci n'est pas significatif. Chez les autres groupes aucun médiateur n'est différent des contrôles.

***Evolution du taux de cytokines dans les condensats pulmonaires***

Dans les condensats, bien que certaines cytokines comme l'IL-4, l'IL-7, l'IL-8, l'IL-12, l'IL-17, l'IFN- $\gamma$  et MCP-1 ressortent chez certains patients impaludés, dans la majorité des cas, les médiateurs inflammatoires étaient en dessous du seuil de détection. Aucune analyse statistique n'a pu être réalisée.

***Taux des IgE totaux et spécifiques de *P. falciparum****

Nous avons également investigué la réponse allergique que pouvaient développer les patients envers l'infection, et son évolution au cours du temps par le dosage des IgE totaux et plasmodiaux dans le plasma. Bien que les IgE totaux soient augmentés chez les différents

Tableau 10a. Elimination des médiateurs inflammatoires à l'admission

Médiateurs inflammatoires	Patients à l'admission (médiane avec interquartiles en pg/ml)								
	T	AS	p-value <sup>a</sup>	AG	p-value <sup>b</sup>	AP	p-value <sup>c</sup>	P	p-value <sup>d</sup>
IL-1β	0,05 (0,00-0,34)	0,02 (0,00-0,28)	ns	0,37 (0,02-0,47)	ns	1,02 (0,35-42,87)	ns	0,00	ns
IL-4	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00 (0,00-0,14)	ns	0,00	ns
IL-5	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00	ns	0,00	ns
IL-6	0,00 (0,00-0,33)	0,95 (0,00-5,64)	0,001	1,27 (0,00-8,06)	0,044	2,46 (1,10-702,70)	0,019	0,00	ns
IL-7	0,00 (0,00-0,64)	0,28 (0,08-1,12)	ns	0,19 (0,00-1,57)	ns	2,58 (0,15-8,34)	ns	0,00 (0,00-0,05)	ns
IL-8	0,00 (0,00-10,11)	3,46 (1,40-8,40)	ns	5,31 (4,21-26,65)	ns	20,12 (14,87-30,21)	ns	0,00 (0,00-17,45)	ns
IL-10	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,03 (0,00-0,09)	ns	0,00	ns
IL-12(p70)	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00 (0,00-0,48)	ns	0,00	ns
IL-13	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00 (0,00-0,01)	ns	0,00	ns
IL-17	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00 (0,00-23,91)	ns	0,00	ns
IFN-γ	0,00	0,00 (0,00-0,49)	ns	0,00	ns	0,00 (0,00-18,14)	ns	0,00	ns
TNFα	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00 (0,00-1,66)	ns	0,00	ns
G-CSF	0,00 (0,00-0,16)	0,00 (0,00-0,36)	ns	0,00 (0,00-0,12)	ns	0,23 (0,00-1345,48)	ns	0,00 (0,00-0,01)	ns
MCP-1	28,20 (0,73-89,54)	136,99 (45,72-245,24)	5,66E-05	59,57 (38,27-581,55)	0,031	133,32 (58,15-209,64)	ns	0,16 (0,00-16,96)	ns
MIP-1β	5,67 (0,00-8,62)	6,33 (1,46-15,45)	ns	5,22 (1,41-17,96)	ns	9,80 (0,41-20,97)	ns	0,00 (0,00-6,10)	ns

Tableau 10b. Elimination des médiateurs inflammatoires à J7

Médiateurs inflammatoires	Patients à l'admission (médiane avec interquartiles en pg/ml)								
	T	AS	p-value <sup>a</sup>	AG	p-value <sup>b</sup>	AP	p-value <sup>c</sup>	P	p-value <sup>d</sup>
IL-1β	0,05 (0,00-0,34)	0,00 (0,00-0,10)	ns	0,00 (0,00-0,14)	ns	1,05 (0,79-1,31)	-	0,00	ns
IL-4	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00	-	0,00	ns
IL-5	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00	-	0,00	ns
IL-6	0,00 (0,00-0,33)	0,00 (0,00-1,02)	ns	0,00 (0,00-0,18)	ns	0,79 (0,46-1,13)	-	0,00	ns
IL-7	0,00 (0,00-0,64)	0,15 (0,01-0,58)	ns	0,06 (0,01-0,12)	ns	0,23 (0,22-0,25)	-	0,00	ns
IL-8	0,00 (0,00-10,11)	2,26 (0,26-9,61)	ns	12,67 (6,16-23,40)	ns	57,29 (56,10-58,47)	-	0,00	ns
IL-10	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00	-	0,00	ns
IL-12(p70)	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00	-	0,00	ns
IL-13	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00	-	0,00	ns
IL-17	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,00	-	0,00	ns
IFN-γ	0,00	0,00 (0,00-16,44)	ns	0,00 (0,00-10,68)	ns	0,00	-	0,00	ns
TNFα	0,00	0,00	ns	0,00	ns	0,06 (0,03-0,08)	-	0,00	ns
G-CSF	0,00 (0,00-0,16)	0,00	ns	0,00	ns	0,00	-	0,00	ns
MCP-1	28,20 (0,73-89,54)	36,63 (16,80-140,28)	ns	103,24 (43,48-236,12)	ns	180,77 (135,54-	-	0,00	ns
MIP-1β	5,67 (0,00-8,62)	3,13 (0,00-8,07)	ns	3,35 (0,79-5,43)	ns	18,45 (18,14-18,75)	-	0,00	ns

Tableau 10c. Elimination des médiateurs inflammatoires à J30

Médiateurs inflammatoires	Patients à l'admission (médiane avec interquartiles en pg/ml)								
	T	AS	p-value <sup>a</sup>	AG	p-value <sup>b</sup>	AP	p-value <sup>c</sup>	P	p-value <sup>d</sup>
IL-1β	0,05 (0,00-0,34)	0,00 (0,00-0,07)	ns	1,04 (0,52-4,90)	ns	-	-	-	-
IL-4	0,00	0,00	ns	0,00	ns	-	-	-	-
IL-5	0,00	0,00	ns	0,00	ns	-	-	-	-
IL-6	0,00 (0,00-0,33)	0,00 (0,00-1,69)	ns	0,00 (0,00-0,22)	ns	-	-	-	-
IL-7	0,00 (0,00-0,64)	0,29 (0,00-0,64)	ns	0,00 (0,00-0,77)	ns	-	-	-	-
IL-8	0,00 (0,00-10,11)	7,20 (1,41-17,73)	ns	100,56 (51,72-226,51)	ns	-	-	-	-
IL-10	0,00	0,00	ns	0,00	ns	-	-	-	-
IL-12(p70)	0,00	0,00 (0,00-0,03)	ns	0,00	ns	-	-	-	-
IL-13	0,00	0,00	ns	0,00	ns	-	-	-	-
IL-17	0,00	0,00	ns	0,00	ns	-	-	-	-
IFN-γ	0,00	0,00 (0,00-24,98)	ns	0,00 (0,00-3,44)	ns	-	-	-	-
TNFα	0,00	0,00 (0,00-0,07)	ns	0,00	ns	-	-	-	-
G-CSF	0,00 (0,00-0,16)	0,00	ns	0,00	ns	-	-	-	-
MCP-1	28,20 (0,73-89,54)	63,85 (25,28-155,76)	ns	48,91 (28,81-133,02)	ns	-	-	-	-
MIP-1β	5,67 (0,00-8,62)	5,96 (4,09-8,38)	ns	5,87 (3,16-10,99)	ns	-	-	-	-

<sup>a</sup>Analyse Mann-Whitney AS J0 vs T

<sup>b</sup>Analyse Mann-Whitney AG J0 vs T

<sup>c</sup>Analyse Mann-Whitney AP J0 vs T

<sup>d</sup>Analyse Mann-Whitney P J0 vs T

groupes de patients impaludés à J0, seul le taux mesuré chez les AP est significativement plus élevé (2300,40 ng/ml, 25-75% quartile: 1008,30-3657,60 pg/ml ;  $p = 0,046$ ) que chez les T (567,84 ng/ml, 25-75% quartile: 386,88-1101,84 pg/ml) (Tableau 11). Chez les P, le taux d'IgE totaux est similaire à celui des T. A J7, une augmentation des IgE plasmodiaux est constatée dans les 3 groupes de patients impaludés mais de façon non significative, alors qu'il baisse chez les P (Tableau 11). A J30, le taux d'IgE chez tous les groupes a baissé, mais reste plus élevé chez les patients impaludés à J0 que chez les T (Tableau 11).

Il n'y a aucune différence significative dans l'expression des IgE plasmodiaux entre les différents groupes de patients, quel que soit le temps de prélèvement (Tableau 11).

### **Taux de P<sub>f</sub>TCTP**

A J0, P<sub>f</sub>TCTP n'est pas ou peu exprimée dans les différents groupes de patients impaludés, hormis chez les AP, mais ce taux n'est pas statistiquement significatif (Tableau 12). A J7, P<sub>f</sub>TCTP est plus fortement exprimée chez les AG (50,00 ng/ml, 25-75% quartile: 10,75-67,50 pg/ml ;  $p = 0,0462$ ) que chez les T (0,00 ng/ml, 25-75% quartile: 0,00-18,00 pg/ml). A J30, aucune différence significative n'est trouvée entre les différents groupes. P<sub>f</sub>TCTP semble corrélérer avec le taux d'IgE plasmodiaux ( $r_s = 0,54$ ).

## **1.3. Discussion**

Nous avons effectué une étude longitudinale prospective avec un suivi de cohorte sur 30 jours afin d'évaluer la réponse immunologique induite chez des patients présentant un accès palustre à *P. falciparum*, en fonction de leur niveau de gravité. Pour cela, nous avons comparé ces patients à des témoins, exempts d'infection plasmodiale et de tout autre signe clinique d'infection pour évaluer la réponse immunologique basale de cette population. Cette réponse immunologique a également été comparée à celle de patients présentant une pneumopathie afin d'évaluer la modulation de celle-ci entre différentes pathologies pour une même population. Le but principal de cette étude fut la mise en évidence de marqueurs liés à la sévérité de l'infection palustre.

La parasitémie est un critère de classification du niveau de gravité des accès palustres. Or celle-ci, du fait de la séquestration des hématies parasitées dans la deuxième partie du cycle de maturation érythrocytaire des parasites (trophozoïtes matures, schizontes), reste un mauvais prédicteur de la mortalité pour les infections à *P. falciparum* en l'absence d'évaluation de la biomasse parasitaire présente chez le patient [109]. Desakorn *et al* ont calculé la quantité moyenne d'HRP2 relarguée pendant la totalité du cycle de maturation érythrocytaire dans des cultures *in vitro* de *P. falciparum*, soit 5.4 fg (2.1-10.2 fg) [110]. Sur la base de ces informations, Dondorp *et al.* en 2005, ont développé un modèle mathématique pour estimer la biomasse parasitaire totale à partir de la concentration plasmatique d'HRP2 sécrétée par les parasites et

Tableau 11. Concentration des IgE totaux et spécifiques de *P. falciparum* et de *PfTCTP* par catégorie de patient et par date de prélèvement

Jour	IgE (ng/ml)	Médiane (25%-75% quantiles)									
		T	AS	p-value <sup>a</sup>	AG	p-value <sup>b</sup>	AP	p-value <sup>c</sup>	P	p-value <sup>d</sup>	
J0	IgE totaux	567,84 (386,88-1101,84)	794,40 (269,76-2134,80)	ns	1090,56 (464,16-2234,88)	ns	2300,40 (1008,30-3657,60)	0,046	481,68 (283,32-1320,84)	ns	
	IgE <i>Pf</i>	5,77 (2,31-9,72)	6,98 (2,86-8,31)	ns	4,22 (0,96-8,75)	ns	3,13 (2,54-4,32)	ns	3,67 (2,97-8,71)	ns	
	<i>PfTCTP</i>	0,00 (0,00-18,00)	0,00 (0,00-30,00)	ns	0,00 (0,00-40,50)	ns	29,50 (14,75-44,25)	-	-	-	
J7	IgE totaux	-	921,36 (412,44-2468,40)	ns	1409,52 (735,00-2431,44)	ns	3301,92 (2165,28-4438,56)	-	304,8 (262,32-688,80)	ns	
	IgE <i>Pf</i>	-	7,02 (4,94-10,35)	ns	3,15 (2,07-5,18)	ns	4,10 (3,00-5,21)	-	3,80 (1,45-10,47)	ns	
	<i>PfTCTP</i>	-	0,00 (0,00-122,00)	ns	50,00 (10,75-67,50)	0,042	0,00 (0,00-0,00)	-	-	-	
J30	IgE totaux	-	636,00 (167,80-1400,76)	ns	928,56 (514,56-1270,08)	ns	1221,84 (860,88-1582,80)	-	228,32 (227,22-229,41)	-	
	IgE <i>Pf</i>	-	3,82 (0,79-6,72)	ns	2,74 (2,57-4,35)	ns	1,23 (0,61-1,84)	-	2,35 (2,28-2,41)	-	
	<i>PfTCTP</i>	-	0,00 (0,00-60,00)	ns	0,00 (0,00-0,00)	ns	0,00 (0,00-0,00)	-	-	-	

<sup>a</sup> Analyse Mann-Whitney AS J0 vs T

<sup>b</sup> Analyse Mann-Whitney AG J0 vs T

<sup>c</sup> Analyse Mann-Whitney AP J0 vs T

<sup>d</sup> Analyse Mann-Whitney P J0 vs T

- absence de valeur

libérée lors de la rupture du schizonte [111]. Ce modèle a été validé chez des patients thaïlandais mais il devait être validé dans les zones de transmission importante comme les aires subsahariennes. Cette validation était nécessaire chez des patients présentant une immunité plus importante pour tenir compte d'une possible diminution de la demi-vie d'élimination de l'antigène *PfHRP2* (environ 3-4 jours pour des patients asiatiques). Hendriksen *et al.* en 2012, ont utilisé ce modèle mathématique chez des enfants africains inclus dans une vaste étude multinationale sur l'efficacité comparée de la quinine et de l'artésunate à laquelle ont participé des équipes médicales de la République démocratique du Congo [112]. Ils ont mis en évidence une augmentation significative du taux moyen plasmatique de *PfHRP2* chez les patients décédés d'un accès palustre (1,611 ng/ml) comparé aux patients qui survivaient (1,046 ng/ml). De même, les patients avec des signes de gravité (coma, acidose ou anémie sévère...) avaient un taux significativement plus élevé de *PfHRP2* que ceux présentant un accès simple. Le modèle mathématique a été réajusté pour tenir compte d'une plus forte transmission du paludisme dans ces régions par rapport au sud-est asiatique avec comme conséquence une immunité plus importante, d'où un taux de multiplication parasitaire par cycle plus faible (multiplié par 3 au lieu de 8) et une demi-vie plasmatique de l'antigène *PfHRP2* plus courte (1,1 jour contre 3,7 jours).

Dans notre étude, nous retrouvons une corrélation entre la concentration plasmatique de *PfHRP2* et les différents groupes de patients classés en fonction des signes cliniques. Chez les accès simples, la concentration moyenne de *PfHRP2* est retrouvée à 279 ng/ml (25-75% quantile : 113-710 ng/ml), valeur correspondant au groupe de faible concentration de *PfHRP2* de l'étude de Hendriksen *et al.* [112]. Dans ce groupe un éventuel décès ne serait pas dû à l'atteinte palustre. Les accès palustres graves de notre étude ont une concentration moyenne *PfHRP2* de 2948 ng/ml (25-75% quantile : 1014-10992 ng/ml). Selon les données de l'étude de Hendriksen *et al.*, ces patients se situeraient dans le groupe des patients à haute concentration de *PfHRP2* (> 1000 ng/ml) pour lequel le taux de mortalité a été évalué à 11,6%. A noter que dans notre étude nous n'avons pas eu à déplorer de décès. A J7, il n'y a plus de *PfHRP2* détectable chez les accès palustres simples, tandis que chez les accès graves nous trouvons encore une concentration moyenne de 47 ng/ml de *PfHRP2*. A J30, aucune concentration de *PfHRP2* n'est détectée, chez aucun groupe.

La concentration de *PfHRP2* est également corrélée aux médiateurs inflammatoires MCP-1, IL-6 et IL-10. La corrélation entre l'IL-6 et *PfHRP2* pourrait traduire une plus forte induction de la fièvre chez les patients présentant une charge parasitaire élevée. Cependant, la concentration de *PfHRP2* n'est pas corrélée avec la température axillaire des patients impaludés. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre la charge parasitaire et la parasitémie chez les patients impaludés, sûrement à cause du phénomène de séquestration mentionné précédemment.

L'absence de corrélation entre l'IFN- $\gamma$  et PfHRP2 suggère également que d'autres facteurs que la charge parasitaire doivent intervenir dans la production d'IFN- $\gamma$  et dans son lien avec la fièvre. Hormis chez certains AG et AP, pour lesquels une plus faible concentration de PfHRP2 est mesurée à J7, tous les dosages correspondant aux autres patients sont négatifs. A J30 tous les échantillons sont négatifs.

Pour le reste de la discussion, nous n'aborderons que brièvement les résultats des patients AP qui, en raison de leur faible effectif, ne peuvent être assez solides pour en faire une interprétation.

Dans cette étude nous avons également mesuré le taux de 17 cytokines dont 10 cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, et IL-17), 3 cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10 et IL-13), 3 chimiokines (IL-8, MCP-1 et MIP-1 $\beta$ ) et 2 facteurs de croissance (G-CSF et GM-CSF) dans le sérum, les urines et les condensats de chacun des patients. Au début de cette étude nous n'avons pas eu la possibilité de moduler le panel de médiateurs inflammatoires ci-dessus.

Les cytokines IL-2 et GM-CSF étaient pour la majorité des échantillons en dessous du seuil. Ce problème a déjà été rencontré auparavant [92].

Dans notre analyse, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  sont plus élevés chez les AS (médiane = 4,54 pg/ml et 11,25 pg/ml) et les AG (5,61 pg/ml et 17,55 pg/ml) que chez les témoins (1,21 pg/ml et 3,31 pg/ml), avec un taux similaire entre les deux groupes de patients impaludés. Cependant, l'élévation de l'IFN- $\gamma$  n'est pas significative entre les AS et les témoins. Les manifestations du paludisme grave peuvent varier en fonction de la localisation géographique et de l'intensité de transmission du paludisme, mais également en fonction de l'âge du patient. Ces patients résidant en zone d'holoendémie, il est probable que leur contact permanent avec le parasite ait un impact sur le taux de ces cytokines pro-inflammatoires comme mentionné dans l'étude de Wroczynska et al. [89]. L'IL-12, respectivement 2 fois et 5 fois plus élevé chez les AS et les AG dans notre étude n'est cependant pas statistiquement différent entre ces 2 groupes. Toutefois, si l'on regarde le ratio avec la cytokine anti-inflammatoire IL-10, on constate un ratio IL-10/IL-12 plus élevé chez les accès graves (ratio = 6,4) que chez les accès simples (ratio = 4). La cytokine anti-inflammatoire IL-10 est fortement plus élevée chez les AS (23,93 pg/ml) que chez les témoins (0,61 pg/ml) et est près de 4 fois plus élevée chez les AG (91,62 pg/ml). En plus du taux de ces cytokines, le ratio de celles-ci peut-être important, comme l'ont montré diverses études [44, 49, 52, 53, 92, 113]. En effet, alors que le ratio IL-10/IL-12 est plus élevé chez les AG (6,4) que chez les AS (4,0), ceux de l'IFN- $\gamma$ /IL-10 et du TNF- $\alpha$ /IL-10 sont plus faible chez les AG (0,19 et 0,06) que chez les AS (0,47 et 0,19), ce qui est en faveur des résultats précédents [52, 114]. L'IL-1 $\beta$ ,

l'IL-4 et l'IL-13 sont également très légèrement mais significativement augmentés chez les patients impaludés à J0, sans différence significative entre les AS et les AG. Ces résultats bien qu'un peu différents du schéma général ont été retrouvés dans d'autres études [115]. La majorité des patients avaient des signes d'infection depuis au moins deux semaines lors de leur première consultation. Il se peut que les cytokines de la réponse Th1 commencent à diminuer en faveur de la mise en place d'une réponse Th2. Nous ne connaissons pas le délai entre les premiers symptômes de la maladie et le jour d'incorporation des autres études. Il n'est pas à exclure que nos patients soit infectés depuis plus longtemps que dans d'autres études. L'IL-4 étant impliquée dans la suppression de l'activité anti-plasmodiale des macrophages, il est normal que son activité soit limitée tant que la clairance parasitaire n'est pas complète [116, 117].

Les taux d'IL-6 et d'IL-8, en plus d'être augmentés par rapport aux témoins, sont également plus élevés chez les accès graves. De plus, l'IL-6 corrèle également avec l'IL-8 et la concentration de *PfHRP2*. L'IL-6 a précédemment été corrélée à la température axillaire des patients impaludés ainsi qu'à la parasitémie [95, 99]. Une étude portant sur l'atteinte tissulaire a également relié la corrélation de l'IL-6 avec l'IL-8 et une chimiokine (MCP-1) à une inflammation aiguë et à une douleur inflammatoire [118]. A leur présentation, les patients manifestant un accès grave présentaient souvent des signes d'arthralgie contrairement aux accès simples.

Nous avons également dosé MCP-1 et un autre marqueur de l'activité macrophagique, MIP-1 $\beta$ , qui sont aussi corrélés à la gravité des symptômes, à l'IL-8 et à l'IL-6 dans notre étude, bien que MCP-1 soit corrélé à l'IL-8 dans une moindre mesure par rapport à MIP-1 $\beta$ . Ces marqueurs n'ont été dosés jusqu'à présent au cours de l'infection palustre que chez des enfants ou des femmes enceintes [113, 119, 120]. Chez la femme enceinte, ces marqueurs ont été impliqués dans l'accumulation de monocytes dans le placenta. Chez les enfants, une élévation de MCP-1 est relevée chez les Fulani en même temps que d'autres médiateurs pro-inflammatoires, dans le cadre d'une étude comparative de la réponse cytokinique mise en jeu entre deux ethnies sympatriques (Fulani vs Dogon) ayant une réponse différente à l'infection palustre. Les Fulani produisent une réponse inflammatoire plus grande envers le parasite que les Dogon. Dans une étude portant sur la réponse inflammatoire de *P. knowlesi*, le dosage de divers médiateurs inflammatoires dont MCP-1 et MIP-1 $\beta$  ont également été réalisés chez quelques patients infectés par *P. vivax* et *P. falciparum* [115]. Les concentrations de MCP-1 et de MIP-1 $\beta$ , augmentés chez les accès simples (médiane = 212.07 pg/ml et 105.48 pg/ml, respectivement) infectés par *P. knowlesi* est accentuée chez les accès graves pour MIP-1 $\beta$  (183.51 pg/ml) mais pas pour MCP-1 (291.17pg/ml). Chez les patients infecté à *P. falciparum*, leurs concentrations sont plus élevées, avec une accentuation chez les accès simples (694.34pg/ml et 410.16 pg/ml) par rapport aux accès graves (208.65 pg/ml et 117.24 pg/ml). Cependant, MCP-1 et MIP-1 $\beta$  sont inversement

corrélés à la gravité de la maladie lors d'une infection à *P. falciparum* alors qu'ils sont positivement corrélés lors d'une infection à *P. knowlesi*. Ils avancent que ces différences peuvent être dues à des différences d'activité des macrophages suivant le type d'infection plasmodiale et les critères de gravité qui y sont associés. MCP-1 étant associé à l'hémoglobine dans leur étude, il se pourrait que cette chimiokine ait un rôle dans l'apparition de l'anémie sévère chez les patients infectés par *P. falciparum*, phénomène non observé lors d'infection à *P. knowlesi*.

Dans notre étude, les taux de MCP-1 sont plus faibles que dans celle de Cox-Singh et *al.*, aussi bien chez les accès simples (11.27 pg/ml versus 694.34pg/ml) que chez les accès graves (82.17 pg/ml versus 208.65 pg/ml). Le taux de MCP-1 dans notre étude est 7 fois plus élevé chez les accès graves, avec un taux d'hémoglobine plus faible chez ces mêmes patients. Les patients infectés par *P. falciparum* dans l'étude de Cox-Singh et *al.* résident en Malaisie, où de petits foyers de paludisme sont présents alors qu'en RDC, la transmission est permanente dans tout le pays. Il est difficile de comparer ces résultats étant donné que nous ne savons pas quels critères pris en compte dans la gravité présentaient ces patients parmi les critères de l'OMS. De plus, ces deux pays ne présentent pas la même endémicité, la population ne possède pas le même fond génétique et les isolats plasmodiaux sont différents. Tous ces critères jouent un rôle dans la réponse immunitaire du patient et font qu'il est difficile d'évaluer celle-ci en vue d'un schéma global. Que ce soit dans leur étude ou dans la nôtre, le nombre d'accès palustre grave est trop faible (respectivement 5 et 9) pour pouvoir affirmer quoi que ce soit. Des cohortes plus importantes seront nécessaires pour valider ces résultats. Par ailleurs, les valeurs des médiateurs inflammatoires dans l'étude de Cox-Singh et *al.* n'étant pas comparés à celles de patients sains, il est difficile d'évaluer véritablement la réponse de ces patients.

L'IL-17 et le G-CSF sont augmentés uniquement chez les AG au cours de notre étude. Leur taux n'est pas très élevé mais semble n'être modulé qu'au cours de l'accès palustre grave. Peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'implication de l'IL-17 dans la pathologie du paludisme. Alors qu'Ayimba *et al.* montrent une augmentation de cette cytokine chez des enfants présentant aussi bien un accès simple que grave, sans différence significative entre ces deux groupes, Wilson et *al.* ne trouvent aucune différence au niveau de son taux entre les témoins et les patients impaludés et était en dessous du seuil de détection chez les patients de l'étude de Cox-Singh et *al.* [101, 113, 115]. Il en est de même pour le G-CSF. L'implication du G-CSF, avec l'IL-10 dans le paludisme asymptomatique chez les femmes enceintes a été suggérée récemment [113].

Chez les AG, l'expression conjointe de l'IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , l'IL-17 et le G-CSF pourrait indiquer un recrutement plus important de monocytes et de neutrophiles à J0. D'ailleurs MCP-1 corrèle avec les neutrophiles dans notre étude. Sherry et *al.* ont montré que les pigments d'hémozoïne

de *P. falciparum* pouvaient induire la production de MIP-1 $\beta$  par les leucocytes [121]. Une étude très récente a également montré que ces pigments d'hémozoïne pouvaient induire la production de divers médiateurs pro-inflammatoires dont MCP-1 au niveau pulmonaire, au cours d'une atteinte pulmonaire associée au paludisme chez la souris [122]. Le G-CSF est impliqué dans la maturation et le fonctionnement des neutrophiles et l'IL-17, produite par les cellules T et les neutrophiles, à la capacité de recruter et d'activer davantage de neutrophiles, modulé par l'IL-8 [123]. L'IL-17 stimule également le relargage d'IL-6 [124]. Tous ces médiateurs ont également un rôle dans l'angiogenèse [125]. Il a récemment été suggéré que l'élément du système du complément C5, contribue à la pathogénicité de paludisme placentaire et cérébral en induisant une dérégulation de la réponse inflammatoire (induction d'IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ ) et angiogénique (induction de l'inhibiteur de l'angiogenèse sFlt-1) [126, 127]. Il semble que la réponse observée chez les accès graves se rapproche des profils observés lors du paludisme cérébral et placentaire. La mesure de l'élément C5 du complément et de sFlt-1 pourraient peut-être nous aider à savoir si l'augmentation des médiateurs inflammatoires chez les accès graves est seulement due à une plus forte charge parasitaire ou si des mécanismes supplémentaires sont activés, aggravant l'infection.

La réponse immunologique modulée lors d'une pneumopathie inclut pratiquement les mêmes effecteurs que l'infection palustre à ces détails près que MCP-1, MIP-1 $\beta$ , l'IL-17, l'IL-10 et le TNF- $\alpha$  restent à un niveau basal et que l'IL-5 et l'IL-7 sont faiblement mais significativement augmentés par rapport aux témoins. Les médiateurs inflammatoires sécrétés communément ont des valeurs proches de celles mesurées chez les AS, mis à part le G-CSF pour lequel la médiane est proche de celle des AG.

Les patients impaludés présentant une atteinte pulmonaire associée, d'après leur profil semblent proches des patients présentant un accès grave au niveau de la réponse cytokinique induite par l'infection palustre, avec une tendance haute.

Le suivi des patients a été réalisé à J7 et à J30. Toutes les infections présentées par les patients ont eu une issue favorable. A J7, les patients ne sont plus infectés par *P. falciparum*, mais il reste encore un faible taux de PfHRP2 chez certains accès graves et des résidus d'ADN parasitaire (vu par diagnostic PCR) chez la plupart des patients impaludés. Ceci peut s'expliquer par un taux de PfHRP2 chez ces individus qui, étant plus élevé est plus long à éliminer. Il a également été montré qu'une production de forts taux d'IL-10, comme c'est le cas dans le groupe d'accès grave, était associée à une plus faible clairance parasitaire [98].

Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\gamma$  et l'IL-4 sont encore significativement élevées à J7 chez les 2 groupes de patients impaludés, accompagnées d'une

augmentation non significative du taux d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 par rapport à J0. A J30, toutes ces cytokines sont revenues à un niveau comparable aux témoins chez les accès graves alors qu'ils sont encore élevés chez les accès simples. L'IL-12 est également légèrement plus élevée chez les accès simples, tandis qu'il reste stable chez les accès graves. Concernant le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , nous obtenons des résultats en désaccord avec les études précédentes [86]. Cependant, l'évolution du TNF- $\alpha$  n'a été évaluée que sur des patients africains résidant en France depuis plusieurs années au moment de l'étude [88]. Bien que Ringwald et *al.* présumant que ces individus ont conservés une certaine immunité, elle n'est sans doute pas le reflet de celle de patients vivant en zone d'endémie. L'IL-12 et l'IL-4, élevées à J3 dans la littérature, apparaissent encore à un taux modérément élevée à J7 aux vues de notre étude [82]. A priori, ces individus n'ont eu aucun symptôme d'infection entre J7 et J30. Nous ignorons si cette réponse peut être due aux différents types de traitements antipaludiques reçus ou à une différence relative à la réponse à l'infection qui rendrait ces individus plus susceptibles de développer une forme grave. Une investigation au niveau génétique (analyse du polymorphisme nucléotidique) pourrait peut-être donner des réponses supplémentaires.

Parmi les médiateurs inflammatoires (IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , IL-17 et G-CSF) significativement plus élevés chez les accès graves, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , l'IL-17 sont revenus à des valeurs contrôles à J7 mais MIP-1 $\beta$  apparaît plus élevé à J30 (non significatif) aussi bien chez les AS que les AG. MCP-1 et MIP-1 $\beta$  étant principalement impliqués dans le recrutement de monocytes/macrophages sur le lieu d'infection, il n'est pas étonnant qu'à J7 ces médiateurs ne soient plus prédominants. Le retour à la normale de MCP-1 et MIP-1 $\beta$  va d'ailleurs dans le même sens que dans les études précédentes faites sur des enfants [101, 102]. Le G-CSF reste élevé à J7 chez les AG et augmente légèrement chez les AS, bien qu'aucune de ces différences ne soient significatives. L'IL-8 n'est plus significativement augmenté par rapport aux témoins à J7, bien que son taux reste plus élevé chez les AG et AS. A J30, il remonte légèrement chez les 2 groupes (avec des taux similaires), redevant statistiquement plus élevé que chez les témoins. L'IL-6, comme l'IL-10, qui restent légèrement plus élevées que chez les témoins à J7, sont revenues à leur taux basal à J30. L'IL-5, l'IL-7 et l'IL-13 sont augmentées par rapport à J0, bien que cette différence ne soit pas significative pour l'IL-13. A J30, alors que l'IL-5, l'IL-7 reviennent à la normale, l'IL-13 reste élevée chez les AS et revient à la normale chez les AG. Il semble qu'une réponse majoritairement axée Th2 se mette en place à J7, tandis que les acteurs de la voie Th1 ont diminués. Ceci serait favorisé par l'augmentation du taux d'IL-4 sécrété et le maintien d'une sécrétion de l'IL-6, qui induisent la différenciation de ce type de cellules. Ces résultats peuvent correspondre à la mise en place d'une immunité protectrice envers *P. falciparum* [128].

Chez les patients présentant une pneumopathie, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-6, l'IL-7 et le G-CSF retournent à la normale à J7. L'IL-8, l'IL-12 et l'IL-4 ont baissés mais restent encore légèrement élevés tandis que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-5 et IL-13 restent au niveau du J0. Nous n'avions pas assez de patients à J30 pour effectuer des analyses statistiques sur ce point de contrôle. Il semble cependant que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  soient également augmentés à J30 comme chez les patients impaludés.

Les patients impaludés présentant une atteinte pulmonaire associée, semblent évoluer de la même manière que les accès palustre graves mis à part que l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$  ne semblent pas être élevés à J30, contrairement à tous les autres groupes de malades.

MCP-1 et MIP-1 $\beta$  semblent être impliqués dans la réponse inflammatoire à *P. falciparum*, n'étant pas différenciellement exprimés des témoins lors de pneumopathies. Ces médiateurs sont également plus fortement exprimés lors d'atteintes plus sévères. L'expression de l'IL-17 et du G-CSF uniquement chez les patients présentant des signes de sévérité peut laisser à penser que ces médiateurs ont un rôle soit dans la sévérité de la maladie soit dans le contrôle de cette aggravation, d'autant plus qu'ils reviennent à la normale après traitement. Tous nos patients ayant connus une issue favorable à cet épisode fébrile, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer le rôle exact de ces médiateurs inflammatoires.

Le maintien d'un taux plus ou moins élevé d'IFN- $\gamma$  après l'infection que ce soit chez les patients impaludés ou chez ceux avec une pneumopathie est assez surprenant. Le maintien d'un taux modérément élevé d'IL-8 à J30 l'est tout autant. Nous pensons qu'à J30 les patients auraient des taux de médiateurs inflammatoires similaires à ceux des témoins, alors que ce n'est visiblement pas le cas, particulièrement chez les accès simples. Il se peut que ces médiateurs soient impliqués dans un processus autre qu'inflammatoire. Une analyse plus globale de la réponse immunologique pourrait permettre de mieux comprendre ces mécanismes.

# *Résultats*

*Approche  
transcriptomique*

## 2. Modulation de la réponse transcriptomique

Les cellules mononucléées du sang périphérique (monocytes, cellules NK et lymphocytes) qui circulent entre la rate, les compartiments lymphatiques et le sang périphérique sont considérées comme les premières lignes de défense contre les agents infectieux et de puissants capteurs biologiques de l'infection. Ces cellules vont détecter des signatures moléculaires à la surface des pathogènes. Des signaux sont ensuite transmis dans la cellule afin d'activer l'expression de gènes codant notamment pour des chimiokines et des cytokines pro- et anti-inflammatoires [129-133]. Dans des circonstances particulières, une induction excessive de médiateurs pro-inflammatoires peut exacerber la pathologie. Les connaissances et la compréhension des mécanismes immunologiques cellulaires et de la réponse inflammatoire chez des patients impaludés avec *P. falciparum* ont été améliorées ces dernières années [67, 120, 134-136]. Cependant, peu d'informations sur les événements survenant au niveau transcriptomique sont connues concernant la réponse de l'hôte à l'infection due à *P. falciparum*. La cinétique d'évolution de l'expression génomique au cours du temps, selon les différents types d'accès palustre (simple à grave) est également peu connue.

Une étude récente conduite au Brésil sur une cohorte de patients atteints par la dengue a montré que l'analyse transcriptionnelle de cellules mononucléées pouvait être utilisée pour identifier des signatures d'expression de gènes prédicteurs d'évolution de cas de dengue simple en dengue hémorragique [137].

Au cours de ces dix dernières années, seulement dix études d'analyse transcriptionnelle ont été menées sur puces à ADN sur la réponse de l'hôte envers une infection palustre. Les premières études ont été menées sur des souris infectées par *P. berghei* ANKA [5, 138-140]. Le but de ces études était de comprendre les mécanismes impliqués dans l'atteinte cérébrale au cours d'un accès palustre. Que l'analyse transcriptionnelle ait été réalisée à partir d'extraits de cerveau ou de cellules mononucléées circulantes, il en ressort principalement une activation de la réponse immunitaire avec une dominance des gènes régulés par l'IFN, une augmentation de la signalisation sous dépendance de la voie NF- $\kappa$ B, une augmentation du métabolisme énergétique (glycolyse et oxydation) et une sous-expression des gènes impliqués dans l'érythropoïèse. Des études portant sur des cultures de cellules endothéliales de cerveau et ombilicales ont également constaté une augmentation de la cascade de signalisation NF- $\kappa$ B et une augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'atteinte cérébrale et l'accès grave en général [7, 141]. Ces résultats ont été complétés par de récentes études sur le transcriptome humain. Une unique étude a été menée à partir de cellules mononucléées d'enfants, au Malawi, afin d'évaluer la mise en place d'une immunité protectrice en examinant le transcriptome d'enfants présentant un accès grave à leur première visite et un accès simple à leur contrôle un

mois plus tard [142]. Il ressort également de cette étude une implication des gènes issus de la voie de signalisation de l'IFN et des cellules T au cours de l'accès palustre simple, qui peuvent avoir un rôle dans le développement de cette immunité protectrice. Par contre, seulement 6 gènes ont été associés à l'accès grave dans cette étude. Deux équipes se sont intéressées à la réponse transcriptomique chez l'adulte [143-146]. Torcia et *al.* se sont intéressés aux différences d'expression entre deux ethnies sympatriques (Fulani vs Mossi) afin de comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'accentuation de la réaction immunitaire chez les Fulani envers une infection palustre à *P. falciparum*. Ces derniers patients ont tendance à avoir une augmentation de l'expression des gènes relatifs à la réponse Th1 et Th2 tandis que les gènes relatifs à l'activité T régulatrice sont sous-exprimés. Dans l'équipe composée de Ockenhouse et Hu, plusieurs travaux comparant la réponse inflammatoire mise en place au cours de la phase pré-symptomatique (patients volontairement infectés par *P. falciparum*, avant apparition de signes cliniques) avec celle de la phase clinique (patients naturellement infectés par *P. falciparum* présentant des signes cliniques d'infection) ont permis de mieux caractériser cette réponse Th1. En effet, les transcrits des gènes principalement activés correspondent à ceux de la réponse de type Th1 via la voie NF- $\kappa$ B, précédemment mise en évidence, avec les gènes impliqués en aval de cette cascade de signalisation comme ceux impliqués dans la phagocytose et l'inflammation (cellules NK, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ), finement régulés par l'IRF-1. Il semble que cette réponse Th1 ne soit pas IL-12 dépendante (gènes impliqués dans l'activation des macrophages non exprimés) mais plutôt sous dépendance de la voie Th $\alpha\beta$  (Th9) médiée par les cellules NK. Par contre, les transcrits de gènes impliqués dans l'expression des CMH I et II sont réprimés chez la majorité des patients. Les gènes impliqués dans la voie Th17 semblent également impliqués (gènes *IL-8*, *IL1B*, *CEBPdelta*, *TGFB1*) tandis que la réponse Th2 ne paraît pas particulièrement modulée. En parallèle des gènes codant pour des protéines « heat shock », la coagulation et des enzymes de la glycolyse amplifient l'inflammation. Les principales différences entre ces deux groupes sont une induction des gènes de l'apoptose via l'augmentation de l'activité des MAPK et du gène *IL1B* chez les patients présentant des signes cliniques. Dans cette étude, les témoins étaient des patients non immuns pour le paludisme.

Nous avons souhaité savoir si les mécanismes mis en jeu au cours d'un accès simple ou grave en comparaison de témoins issus de la même population étaient semblables à ceux identifiés jusqu'à présent et de tenter d'identifier les marqueurs moléculaires prédictifs de la sévérité et/ou de la résolution de la maladie.

Afin de déterminer les mécanismes transcriptionnels associés à la gravité du paludisme à *P. falciparum*, nous avons examiné le profil d'expression dans des cellules nucléées chez les patients sélectionnés lors de l'analyse immunologique. Nous nous sommes tout d'abord intéressés

à la modulation du transcriptome entre les patients impaludés en comparaison des témoins. Seuls les échantillons ayant le meilleur rendement d'extraction d'ARN (voir matériel et méthode) ont été analysés sur puces à ADN. Le premier groupe était composé de 12 témoins. Le second et le troisième groupe étaient composés respectivement de 21 patients présentant un accès simple à *P. falciparum* et de 9 patients présentant un accès grave. La qualité d'extraction des patients présentant une atteinte pulmonaire associée à un accès palustre n'était pas suffisante pour les analyser sur puces. Nous avons donc choisi de nous concentrer sur les patients impaludés uniquement. Les cellules nucléées ont été collectées au moment de l'incorporation de l'étude, au cours d'un épisode fébrile, après confirmation par TDR et frottis sanguin positifs à *P. falciparum* mais avant toute prise de traitement.

Au cours de cette analyse, nous allons présenter les mécanismes communs et uniques à chaque groupe, en espérant pouvoir faire ressortir des gènes impliqués dans la sévérité de la maladie. Les distinctions au niveau de l'ontologie des gènes et des réseaux d'interaction de gènes sont examinées afin de voir les complexités de la réaction immunitaire et la régulation de celle-ci.

## 2.1. Matériel et méthodes

### *Préparation des échantillons sanguins*

Pour chacun des 145 patients, un échantillon de sang total (2.5 ml) a été collecté dans un tube PAXgene™ à ARN (PreAnalytiX™, Hombrechtikon, Suisse). Ce tube a été ensuite laissé à température ambiante pendant 2 heures afin que la lyse des cellules soit complète, puis conservé à -80°C jusqu'à son transfert en France en carboglace. L'extraction d'ARN a été effectuée avec le kit "PAXgene™ Blood RNA" (Qiagen, Hilden, Allemagne) sur les 94 échantillons sélectionnés lors de l'analyse immunologique. Les ARN totaux purifiés ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation (dans un délai maximum d'un mois).

### *Puces à ADN génomique humaines*

L'intégrité des 94 ARN<sub>m</sub> extraits a été vérifiée avec le BioAnalyzer 2100 d'Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) et quantifiée avec un spectrophotomètre de type NanoDrop ND-1000 (NanoDrop® Technologies). Seuls les échantillons présentant les meilleurs rendements ont été conservés en vue de l'hybridation sur puces à ADN soit 47 échantillons comprenant 12 témoins, 21 accès palustres simples, 11 accès palustre graves et 5 patients avec une pneumopathie simple. La qualité des extraits provenant des patients impaludés avec atteinte pulmonaire associée n'étaient pas suffisants pour l'analyse transcriptomique.

300 ng d'ARN ont été convertis en ARN<sub>c</sub> marqués avec des nucléotides couplés à la cyanine-3 CTP (Cy-3) avec le kit One-Color Quick Amp Labeling (version 5.7 du protocole) (Agilent Technologies), utilisé selon les recommandations du fournisseur. Les ARN<sub>c</sub> marqués sont ensuite purifiés sur colonne RNeasy mini (Qiagen, Hilden, Allemagne). Le niveau d'incorporation du marquage des ARN<sub>c</sub>, leur rendement ainsi que le profil d'amplification ont été évalués au NanoDrop et au bioanalyzer Agilent 2100. Seuls les ARN<sub>c</sub> répondants à tous les critères de qualité (définis dans le protocole Agilent) ont été sélectionnés pour l'hybridation sur puces. Des quantités égales d'ARN<sub>c</sub> marqués à la Cy3 ont été hybridées sur puce contenant le génome humain complet (4x44K Oligo puces G4112F) pendant 17 heures à 65°C. Les puces hybridées ont ensuite été lavées selon les recommandations du fabricant. Les puces ont été scannées avec le scanneur de puces à ADN Agilent G2505B.

### ***Analyse des puces à ADN***

Les données sont extraites des scans à l'aide du logiciel Feature Extraction version 9.5 (Agilent Technologies). Les analyses des puces a été faite en 3 étapes à l'aide du logiciel Genespring GX version 12.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA): (1) une normalisation des données brutes, (2) une sélection des gènes différentiellement exprimés à l'aide d'une analyse ANOVA et (3) une analyse statistique des termes d'ontologie associés à ces gènes et les voies métaboliques associées à ces derniers. Une analyse d'enrichissement de gènes (GSEA) a également été effectuée avec un algorithme d'enrichissement basé sur un test U de Mann-Whitney. Le principe étant de déterminer si un ensemble de gènes évolue de manière coordonnée et significative à travers deux états biologiques différents. Cette analyse de GSEA se focalise sur les groupes de gènes qui partagent une fonction biologique commune tout en révélant les différences d'expression de chaque transcrit.

## **2.2. Résultats**

### ***Identification des gènes différentiellement exprimés entre les groupes***

Afin de mieux comprendre la réponse inflammatoire mise en jeu au cours de l'accès palustre et les mécanismes impliqués dans la sévérité de la maladie, nous avons comparé le profil d'expression global des cellules du sang périphérique de 12 témoins, 21 de patients présentant un accès simple et de 9 patients présentant un accès palustre grave.

**Tableau 12. Liste des principaux GO à partir des gènes ayant un fold-change supérieur à 2 chez les patients avec accès simple ou grave à J0.**

Termes des GO	Description des GO	Nb de gènes/total	P value corrigée
<b>Groupe AG</b>			
GO:000087 GO:0000279	M phase of mitotic cell cycle	57	1,33E-15
GO:0022403	Cell cycle phase	85	6,23E-14
GO:0051707 GO:0009613 GO:0042828	Response to other organism	61	3,27E-12
GO:0006950	Response to stress	192	4,58E-12
GO:0006955	Immune Response	85	5,92E-12
GO:0009607	Response to biotic stimulus	62	8,25E-12
GO:0045087 GO:0002226	Innate immune response	54	7,13E-11
GO:0002376 GO:0002682	Immune system process	113	6,91E-10
GO:0007049	Cell cycle	101	9,50E-10
GO:0009617 GO:0009618 GO:0009680	Response to bacterium	41	8,73E-09
GO:0042221	Response to chemical stimulus	175	1,03E-06
GO:0044427	Chromosomal part	52	2,52E-06
GO:0033993	Response to lipid	56	4,92E-06
GO:0032496	Response to lipopolysaccharide	27	7,36E-06
GO:0071345	Cellular response to cytokine stimulus	37	1,27E-05
GO:0034097	Response to cytokine stimulus	44	1,78E-05
GO:0006334	Nucleosome assembly	19	5,24E-05
GO:0060333 GO:0071346	Interferon-gamma-mediated signaling pathway	15	3,02E-04
GO:0071346	Cellular response to interferon-gamma	16	3,03E-04
GO:0019221	Cytokine-mediated signaling pathway	31	5,55E-04
GO:0071310	Cellular response to organic substance	74	5,78E-04
GO:0071156	Regulation of cell cycle arrest	29	5,89E-04
GO:0034341	Response to interferon-gamma	17	8,46E-04
GO:0005576	Extracellular region	134	9,84E-04
GO:0000786 GO:0005718	Nucleosome	13	0,002
GO:0002455	Humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	9	0,006
GO:0002443 GO:0019723 GO:0042087	Leukocyte mediated immunity	16	0,006
GO:0051716	Cellular response to stimulus	253	0,008
GO:0060337 GO:0071357	Type I interferon-mediated signaling pathway	12	0,012
GO:0071357	Cellular response to type I interferon	12	0,012
GO:0005575 GO:0008372	Cellular component	751	0,014
GO:0031347	Regulation of defense response	33	0,015
GO:0005829	Cytosol	133	0,020
GO:0006979	Response to oxidative stress	25	0,022
GO:0001906 GO:0031640 GO:0001908	Cell killing	8	0,030
GO:0034612	Response to tumor necrosis factor	11	0,039
GO:0071216	Cellular response to biotic stimulus	11	0,039
GO:0060397	JAK-STAT cascade involved in growth hormone Signaling pathway	3	0,041
GO:0002460	Adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from Immunoglobulin superfamily domains	13	0,048
GO:0042035	Regulation of cytokine biosynthetic process	13	0,048
<b>Groupe AS</b>			
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	44	2,86E-18
GO:0022403	Cell cycle phase	62	4,74E-17
GO:0007049	Cell cycle	70	1,52E-12
GO:0006950	Response to stress	109	3,32E-09
GO:0006952 GO:0002217 GO:0042829	Defense response	46	1,08E-05
GO:0006955	Immune response	43	3,31E-05
GO:0005694	Chromosome	36	4,10E-05
GO:0005829	Cytosol	83	4,62E-04
GO:0045087 GO:0002226	Innate immune response	25	0,001
GO:0009607	Response to biotic stimulus	28	0,001
GO:0033993	Response to lipid	31	0,001
GO:0050776	Regulation of immune response	27	0,003
GO:0015630	microtubule cytoskeleton	36	0,009

Un test ANOVA avec une correction de Benjamini-Hochberg à 5% de taux d'erreur (FDR), a permis de sélectionner 8901 entités différentiellement exprimées entre les AG, AS et T à J0 et à J7. Parmi ces entités, 5344 ont une différence d'expression  $\geq 2$ . Chez les AS et les AG, 530 et 1212 étaient respectivement surexprimées par rapport aux témoins alors que 248 et 365 étaient sous-exprimées à J0. A J7, 1397 (AS) et 817 (AG) entités étaient surexprimées par rapport à J0 et respectivement 744 et 1121 étaient sous-exprimées.

### ***Catégorisation fonctionnelle par ontologie de gènes (GO)***

Les 5344 sondes différentiellement exprimées entre les patients impaludés à différents temps et les témoins ont été traités à l'aide d'une analyse des GO. Cette analyse permet une meilleure compréhension des processus fonctionnels activés ou réprimés. Les résultats sont classés sur la base de trois termes de GO indépendants : les processus biologiques, les fonctions moléculaires et les composantes cellulaires.

Les processus biologiques modulés à J0 dans cette étude correspondent à la réponse immune innée (GO:0045087 et GO:0002226) mais aussi adaptative (GO:0002443, GO:0019723, GO:0042087 et GO:0002460), à la réponse inflammatoire en réponse à un organisme étranger (GO:0009617, GO:0009618 et GO:0009680) et à une activation cellulaire (GO:0000087, GO:0000279 et GO:0022403), en partie impliquée dans la dégradation des protéines (Tableau 12). Chez les accès simples, il semble également y avoir une modulation du complexe de l'hémoglobine. Aucun GO significatif ne ressort d'après les gènes sous-exprimés chez ces patients.

En comparaison du profil transcriptomique des patients à J0, les gènes surexprimés aussi bien chez les accès simples que chez les accès graves à J7 sont principalement impliqués dans le processus biologique du transport d'oxygène par l'hémoglobine illustré par le complexe de l'hémoglobine (GO:0005833) et le transport de gaz (GO:0015669). Ces modulations ont lieux au niveau de la membrane plasmique (GO:0014731 et GO:0030863). On retrouve également chez les accès simple le maintien d'une activité cellulaire comme la différenciation cellulaire (GO:0030154) et dans l'homéostasie (GO:0055082, GO:0006873).

En parallèle parmi les gènes sous-exprimés, on retrouve principalement des GO liés à la réponse inflammatoire et immunitaire comme la réponse au stress (GO:0006950), la réponse de l'IFN de type I (GO:0034340), la réponse immune (GO:0006959, GO:0045824 et GO:0006958) et des cytokines associées (GO:0032755, GO:0001817, GO:0001819 et GO:0071345), qui étaient surexprimés à J0.

Afin d'affiner ces résultats, nous avons analysé les voies métaboliques dans lesquelles pouvaient être impliqués ces gènes.

GO:0042742 GO:0042830	Defense response to bacterium	11	0,010
GO:0010743	Regulation of macrophage derived foam cell differentiation	6	0,013
GO:0002250	Adaptive immune response	10	0,019
GO:0005576	Extracellular Region	72	0,023
GO:0002443 GO:0019723 GO:0042087	leukocyte mediated Immunity	10	0,034
GO:0005833	Hemoglobin complex	4	0,034
GO:0006959	Humoral Immune Response	9	0,041
GO:0034080 GO:0034509	CENP-A containing nucleosome assembly at centromere	5	0,046
GO:0009986 GO:0009928 GO:0009929	Cell surface	22	0,046
GO:0002460	Adaptive immune response based on somatic recombination of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	9	0,049

---

### **Voies métaboliques modulées à J0**

Les principales voies métaboliques associées aux gènes modulés au cours de l'accès palustre correspondent à une activation de l'immunité, l'activation cellulaire dont la dégradation des protéines par ubiquitination, le transport de molécules et de l'apoptose.

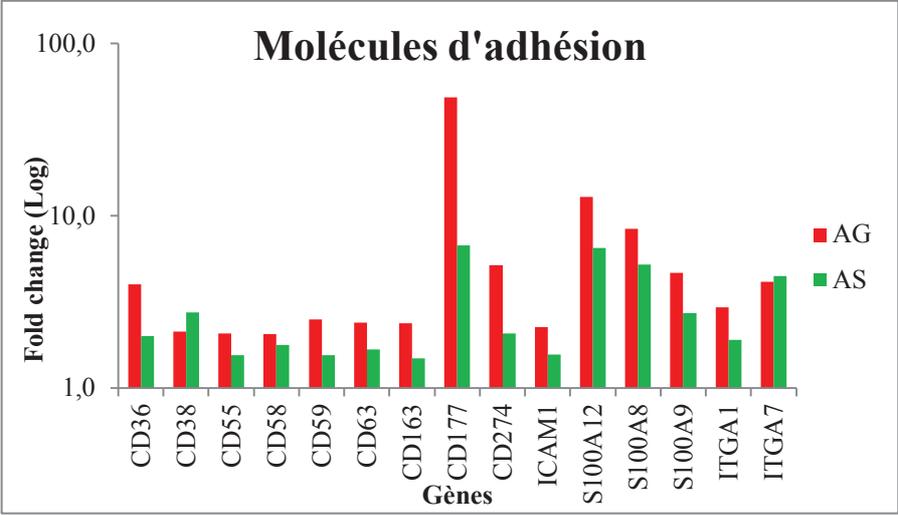
#### Gènes impliqués dans l'immunité

Nous avons observé une importante activation des gènes codant pour les molécules d'adhésion et des intégrines, spécialement chez les accès graves (Fig. 4, Panel A). La molécule d'adhésion *CD177*, exprimée spécifiquement à la surface des neutrophiles, est la plus fortement exprimée avec un fold-change de respectivement 48,7 et 6,8 pour les accès graves et les accès simples par rapport aux témoins. Les autres molécules d'adhésion sont impliquées dans l'activation et la prolifération des lymphocytes (*CD38*, *CD58* et *CD274*), des monocytes/macrophages (*CD163*) et du complément (*CD55* et *CD59*). Les gènes impliqués dans l'activation du complément comme *C1QA*, *C1QB*, *C1QC*, *C2* et *SERPING1* (Fig. 4, Panel B et figure 5) sont également surexprimés avec une *p-value* de  $1,99.10^{-05}$  chez les AG et de  $7,00.10^{-04}$  chez les AS. Les transcrits de cytokines et de chimiokines codant pour l'IL-1 $\beta$ , l'IL-10, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  sont aussi élevés (Fig. 4, Panel C). La voie de signalisation de l'IFN- $\gamma$  est particulièrement impliquée dans la réponse à l'infection palustre chez les accès graves ( $p = 0,00$ ) et dans une moindre mesure chez les accès simples (0,002) (Fig.4, Panel D). Le gène codant pour MCP-1 (*CCL2*), impliqué dans l'attraction des monocytes, est activé chez les accès graves alors qu'il est réprimé chez les accès simples (Fig. 4, Panel C). Les gènes codant pour les CMH de classe I sont surexprimés (*HLA-A*, *HLA-G* et *HLA-L*), alors que ceux codant pour les CMH de classe II (*CIITA*, *HLA-DOA* et *HLA-DMB*) sont sous-exprimés (Fig. 4, Panel E). Toutes les voies de signalisation liées à la réponse immunitaire sont rassemblées dans le tableau 13.

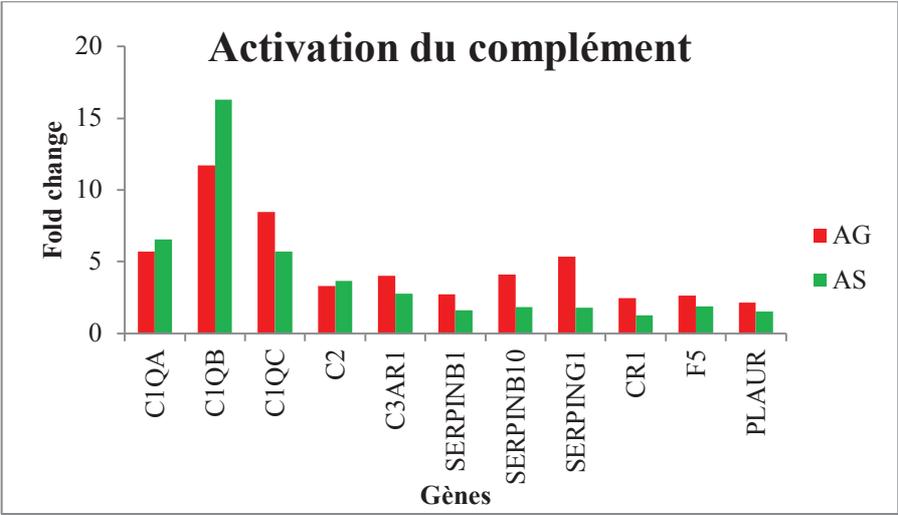
#### Gènes impliqués dans l'activité cellulaire

De nombreux transcrits de gènes relatifs à l'activité cellulaire sont surexprimés. On retrouve notamment des gènes codant pour des cyclines, essentielles au contrôle du bon déroulement du cycle cellulaire. Dans notre analyse, les gènes de cyclines surexprimés sont ceux des différentes phases de transition du cycle : l'initiation de la phase G1 avec *CDC6*, la phase de transition G1/S avec *CCNA2*, *CCND2*, *CDC6*, *CDC25A* et *CCND3* qui correspond à l'initiation de la réplication de l'ADN, la phase de transition S/G2 avec *CDK1*, *CDCA5* et *CCNA2* pour l'entrée en contrôle de réplication de l'ADN synthétisé avec éventuellement réparation de celui-ci et la phase de transition G2/M les gènes codant pour *CCNA2*, *CCNB1*, *CDCA3*, *CCNB2* qui correspond à l'entrée en division cellulaire, comme les cellules de l'immunité par exemple. Nous avons également une

**Figure 4.** Comparaison de l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire chez les accès simples (AS) et les accès graves (AG) à J0. Le fold change des gènes correspond à la différence d'expression des gènes chez les AS et les AG par rapport aux témoins.



Panel A : Molécules de surface modulées chez les AG et AS à J0.



Panel B : Gènes modulés dans l'activation du complément chez les AG et AS à J0.

activation des kinésines, qui agissent comme des moteurs des microtubules au cours de la mitose (Tableau 14).

On retrouve également des gènes impliqués dans l'ubiquitination et la dégradation de protéines via le complexe APC (Anaphase promoting complex)-cyclosome, le protéasome ou encore les inflammasomes (Tableau 15).

#### Gènes impliqués dans le transport.

Une activation des gènes codant pour des transporteurs est également mesurée (Fig. 4, Panel F). Parmi ces gènes, les transporteurs les plus fortement exprimés sont ceux du glutamate (*SLC1A3* et *SLC1A7*). On retrouve ensuite des transporteurs d'acides aminés anioniques (*SLC26A8* et *SLC04A1*), du glucose (*SLC2A14* et *SLC2A3*), des transporteurs d'acides aminés cationiques (*SLC22A4* et *SLC7A2*) ou encore un transporteur mitochondrial (*SLC25A21*).

#### **Voies métaboliques modulées à J7**

Une répression globale des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et/ou inflammatoire surexprimés à J0, que ce soit ceux impliqués dans la signalisation de l'IFN- $\gamma$ , dans la dégradation des protéines (protéasome), dans la signalisation des TLR, l'inflammasome ou les voies de signalisation des interleukines est observée à J7 (Annexe 3).

Par contre, il semble que les gènes impliqués dans la synthèse de l'hème soient particulièrement surexprimés à J7, aussi bien chez les accès simples que graves.

#### Synthèse de l'hème

Nous retrouvons presque tous les gènes impliqués dans la synthèse de l'hème surexprimés, qui étaient déjà modérément surexprimés chez les individus à J0 (Fig. 6, Panel A, B et C). Parmi ces gènes, le gène codant pour l'hémoglobine zeta (*HBZ*) est le plus exprimé respectivement chez les accès simples (7,0) et chez les accès graves (11,09). On retrouve également le gène *AHSP*, qui prévient l'agrégation de l'hémoglobine de type alpha et le gène *HBG1* codant pour cette hémoglobine (Fig. 6, Panel A, B et C). Nous retrouvons également des gènes impliqués dans la dégradation de l'hémoglobine et la prise en charge de l'hème comme *HP* et *HPR* qui codent pour l'haptoglobine et *HPX* qui code pour l'hémopexine, avec une expression plus importante chez les accès graves (respectivement 9,95 ; 10,80 et 1,86) par rapport aux accès simples (2,83 ; 2,20 et 1,20). Ces gènes étaient déjà surexprimés à J0 dans une moindre mesure, aussi bien chez les

**Tableau 13. Voies métaboliques relatives à l'immunité surexprimées chez les individus impaludés à l'admission.**

Voies métaboliques relatives à l'immunité		
SM	P-value	Nb d'entité/Nb total
Type II interferon signaling (IFN- $\gamma$ )	0	13/37
Interleukin-1 processing	2,79E-08	5/5
Senescence and Autophagy	5,01E-06	14/106
Complement and Coagulation Cascades	1,99E-05	9/64
Interferon alpha-beta signaling	7,16E-05	6/26
Regulation of toll-like receptor signaling pathway	8,57E-05	14/150
Complement Activation, Classical Pathway	9,17E-05	5/17
Regulation of Complement cascade	1,64E-04	4/10
Interleukin-1 signaling	7,08E-04	4/15
IL-4 signaling pathway	0,001	7/55
Interleukin-11 Signaling Pathway	0,001	6/40
Oxidative Stress	0,002	5/30
Toll-like receptor signaling pathway	0,003	9/102
IL-12 signaling pathway	0,004	3/11
Cytokines and Inflammatory Response	0,005	4/30
Lymphocyte TarBase	0,005	23/420
TRAF6 mediated IRF7 activation	0,005	2/4
IL-6 signaling pathway	0,009	5/42
IL-9 signaling pathway	0,012	3/17
IL-4 signaling pathway	0,013	5/49
IL-2 Signaling pathway	0,020	4/36
IL-5 signaling pathway	0,034	4/40
IL-2 Signaling pathway	0,040	4/43
IL-7 signaling pathway	0,041	3/27
IL-2 Signaling pathway	0,043	4/43
<b>UM</b>		
Interleukin-1 processing	5,58E-10	5/5
Complement Activation, Classical Pathway	6,32E-05	4/17
Complement and Coagulation Cascades	7,00E-04	5/64
Type II interferon signaling (IFN- $\gamma$ )	0,002	4/37
Regulation of toll-like receptor signaling pathway	0,003	7/150
Regulation of Complement cascade	0,008	2/10
Toll-like receptor signaling pathway	0,012	5/102
Senescence and Autophagy	0,013	5/106
TGF beta Signaling Pathway	0,026	5/118
Lymphocyte TarBase	0,035	11/420

accès graves (6,07 ; 5,82 et 1,35) que chez les accès simples (1,90 et 1,69), hormis le gène *HPX* sous-exprimé chez les accès simples à J0 (-1,63) (Figure 7).

### **Voies métaboliques à J30**

Des gènes sont encore surexprimés à J30 chez les patients impaludés par rapport aux témoins. Ces gènes sont principalement impliqués dans la médiation cellulaire.

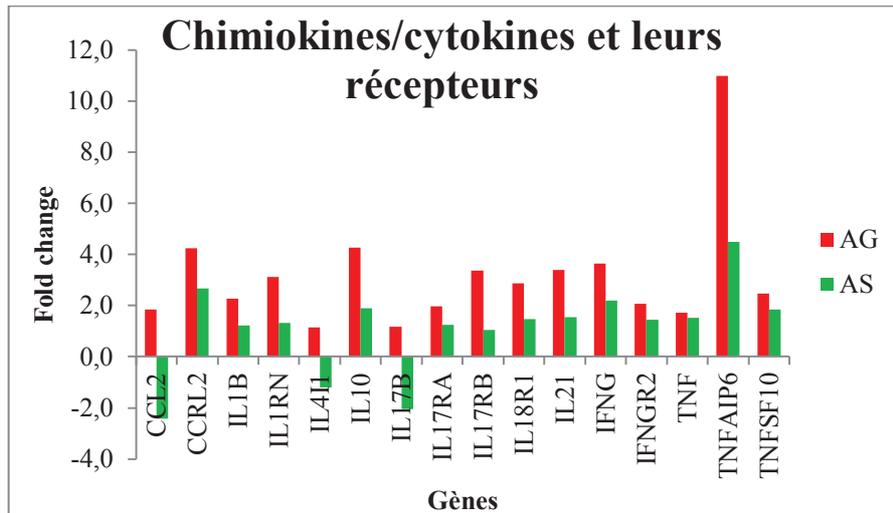
## **2.3. Discussion**

Dans cette étude, nous avons comparé le profil d'expression des gènes chez des patients présentant un accès palustre simple ou un grave avec des témoins issus de la même population, dans le but d'identifier des groupes de gènes modifiés au début de la maladie et au décours du traitement (prélèvements à J7 et J30). La comparaison des profils d'expression de gènes a été réalisée à partir 12 témoins, 21 patients présentant un accès simple et 9 patients présentant un accès grave. Le nombre de patients traités dans ce cadre est inférieur à celui de l'étude immunologique car nous avons sélectionné les échantillons après extraction d'ARN selon les critères de qualité préconisés pour la réalisation de l'étude du transcriptome sur puce à ADN. Ce nombre de patients étudié est relativement similaire à celui des études précédemment publiées. Dans les études de Hu et Ockenhouse, les profils transcriptomiques de 22 patients servant à la fois de témoins et de volontaires impaludés ont été comparés à ceux de 15 patients camerounais afin d'étudier la réponse inflammatoire induite au cours de l'infection palustre précoce et aigüe [143-145]. Les études de Griffiths *et al.* et de Torcia *et al.* étaient respectivement composées de 28 (6 témoins, 15 patients impaludés et 7 patients avec d'autres infections) et 26 patients (13 Mossi et 13 Fulani) au total, tandis que celle de Krupka *et al.* était composée de 5 patients dont la réponse à l'infection palustre est comparée à un mois d'intervalle [142, 146, 147]. La seule étude qui comprend un nombre de patients plus élevé est celle d'Idaghdour *et al.* avec 94 enfants africains impaludés (moyenne d'âge de 3,7 ans) et 61 témoins [148].

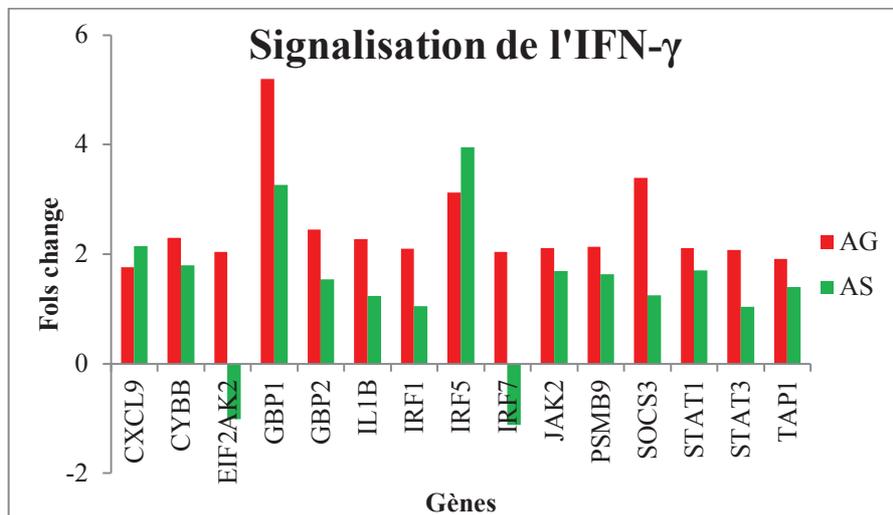
Trois points donnent cependant une certaine originalité à nos travaux:

- l'étude sur l'ensemble des éléments nucléés du sang veineux périphérique;
- l'étude simultanée cytokinique et transcriptomique;
- et l'évolution du transcriptome des éléments nucléés du sang dans le temps.

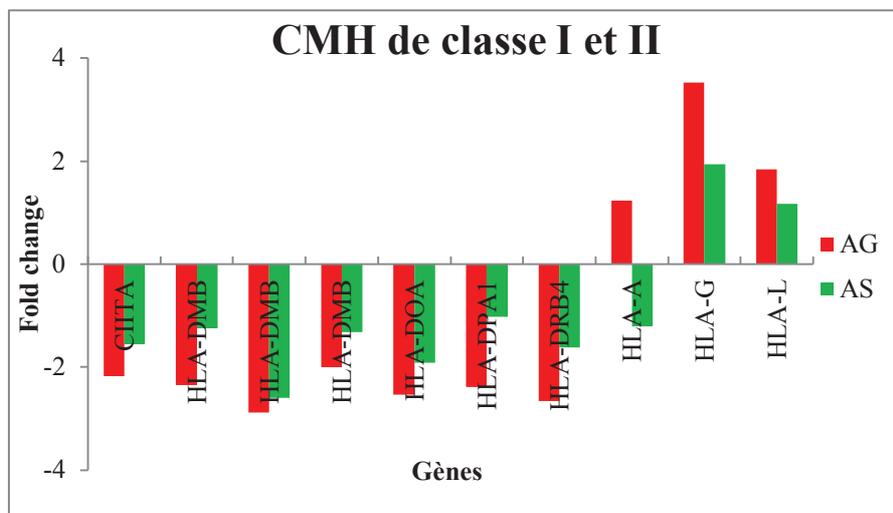
L'étude transcriptomique de l'ensemble des éléments nucléés du sang (lymphocytes, monocytes et polynucléaires) a été imposée par la méthodologie du prélèvement veineux. En effet voulant



Panel C : Chimiokines, cytokines et leurs récepteurs modulés chez les AG et AS à J0.



Panel D : Gènes surexprimés dans la signalisation de l'IFN- $\gamma$ .



Panel E : Gènes codant pour les CMH de classe I et II

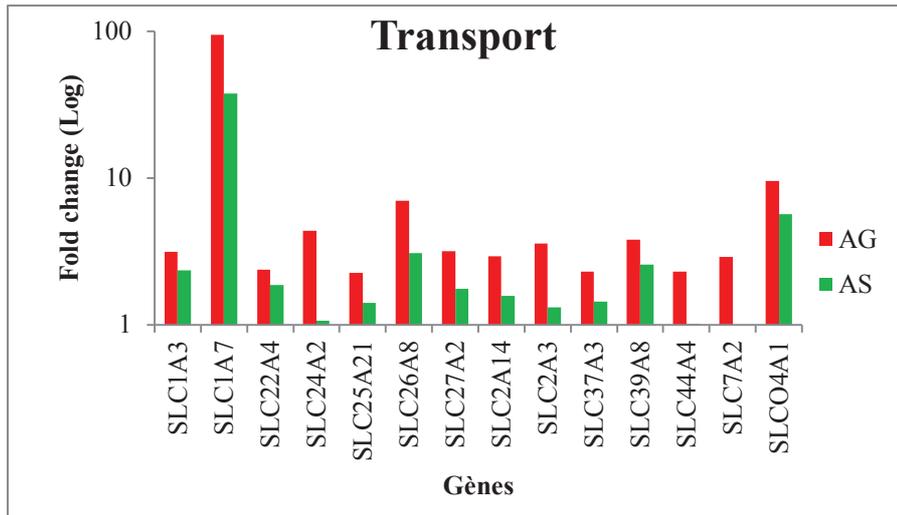
éviter au maximum les manipulations des cellules hors de leur élément naturel, nous avons utilisé des tubes Paxgene® dans lesquels est présente une solution contenant un additif qui stabilise les ARN dès le prélèvement et réduit leur dégradation. L'objectif est de limiter au maximum la durée du stress des cellules dû aux différentes manipulations. Cette stratégie nous permet également d'analyser simultanément le profil d'expression parasitaire que nous ne pourrions pas présenter dans le cadre de ce document, le traitement et l'analyse des échantillons n'étant pas finalisés.

L'étude de Griffiths et *al.* est la seule où la technique de prélèvement est identique à la nôtre [143-145]. Les autres travaux portent uniquement sur les cellules mononuclées obtenues après séparation des cellules par gradient de Ficoll ou par gel séparateur avec centrifugation, manipulations qui peuvent induire une activation des gènes avant que le blocage des ARN ait lieu [143-145].

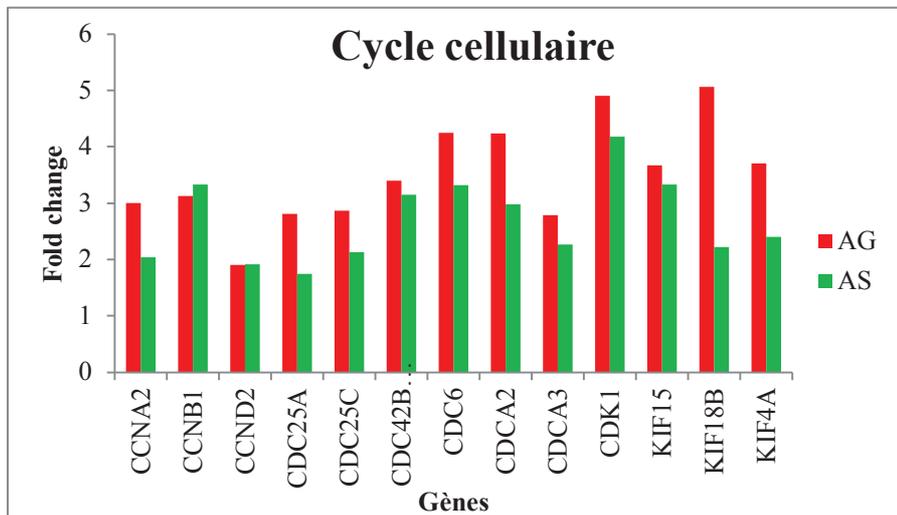
Dans l'interprétation des profils d'expression obtenus, il est nécessaire d'avoir à l'esprit que ce que nous observons est plutôt le reflet des événements survenant dans les cellules présents dans la circulation sanguine périphérique afin de ne pas sur-interpréter les résultats obtenus. En particulier, ils ne peuvent être le reflet des événements survenant au niveau des centres germinatifs, des ganglions lymphatiques ou des interactions survenant dans les organes profonds.

Au cours de la phase aiguë de l'infection palustre à *P. falciparum*, la réponse immune est fortement modulée. Le gène de l'IFN- $\gamma$  et les gènes associés à la voie de signalisation de celui-ci sont surexprimés chez les AS et les AG, avec une expression plus marquée chez les AG. Ces observations sont cohérentes avec les travaux précédents [5, 143, 145, 149]. Cette voie de signalisation est considérée comme un puissant inducteur de l'immunité innée, par l'intermédiaire de l'activation des TLRs entre autres [145, 149]. Les TLRs qui jouent un rôle dans l'infection palustre par leur surexpression sont les *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR8* et *TLR9*, avec le *TLR9* qui jouerait un rôle majeur dans cette infection. A l'opposé, les *TLR3* et *5* seraient sous-exprimés [143]. Dans notre étude, les *TLR1*, *2*, *4* et *8* sont retrouvés modérément surexprimés, non significativement différents entre les (fold change : 1,2-1,5) et les AG (1,6-1,8), associés à une surexpression du *TLR5* (AS = 2,0 et AG = 2,5). Le *TLR9* n'est pas différentiellement exprimé entre les patients de notre étude.

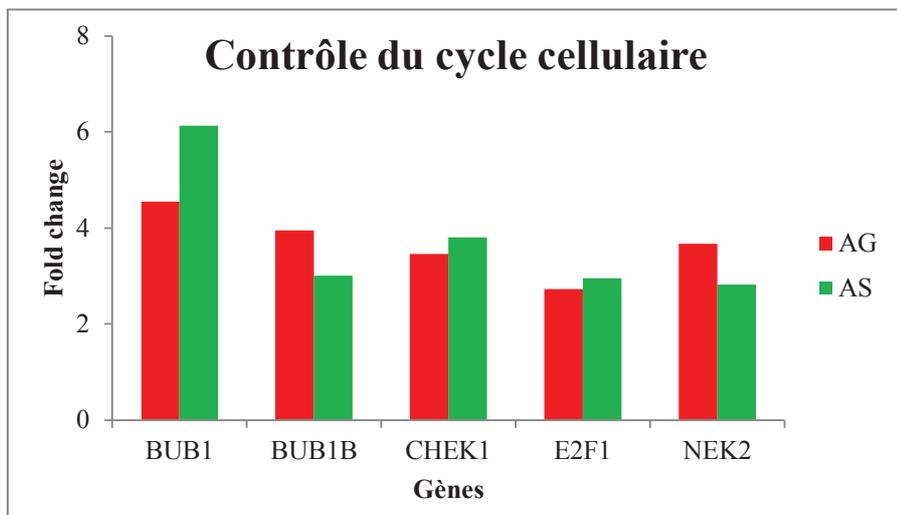
Nous avons trouvé un gène codant pour un autre récepteur fortement surexprimé, le *CD177*. Le gène codant pour cette glycoprotéine, exprimée spécifiquement à la surface des neutrophiles, est retrouvé 6,8 fois plus exprimé chez les accès simples et 48,7 fois plus exprimée chez les accès graves par rapport aux témoins. Hu et *al.* ne pouvaient sans doute pas le mettre en évidence



Panel F : Gènes codant pour les molécules de transport



Panel G : Gènes codant pour les différentes phases du cycle cellulaire



Panel F : Gènes impliqués dans le contrôle des différentes étapes du cycle cellulaire.

puisqu'ils étudiaient le profil de cellules mononuclées, dont les neutrophiles sont absents [143]. Le *CD177* ou l'antigène spécifique des neutrophiles HNA-2a ou NB1, initialement découvert dans les syndromes myéloprolifératifs, jouerait un rôle dans la migration transendothéliale des neutrophiles. Il pourrait également jouer un rôle dans les interactions avec les plaquettes par l'intermédiaire de PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) [150]. Classiquement, on ne fait pas jouer un rôle majeur aux neutrophiles dans l'infection palustre. Ladhani, et *al.* en 2002, ont observé une hyperleucocytose (hyperlymphocytose et neutrophilie) chez les patients impaludés à *P. falciparum*, dont l'importance est corrélée à la gravité de l'accès et à la mortalité [151]. Dans les études transcriptomiques, seuls Griffiths et *al.* mettent en évidence une relation entre l'infection palustre et l'activité des neutrophiles alors que les patients étudiés ne présentaient pas de signe d'infection bactérienne [147]. Les neutrophiles et l'IL-17, sécrétée par les cellules CD4 retrouvée élevée chez nos patients atteints d'accès grave, sont les principaux effecteurs de l'immunité précoce de type Th17. Bien que les transcrits du gène *IL17* ne soient pas augmentés, les gènes en lien avec l'IL-17 (*IL17B*, *IL17C*, *IL17RA* et *IL17RB*), impliqués dans le recrutement des neutrophiles, sont significativement augmentés dans les accès graves de notre étude. Classiquement, la voie Th17, initiée par le TGF- $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-17, a un rôle important dans la réponse de l'hôte envers des pathogènes bactériens extracellulaires et dans la sécrétion IgA, IgM et IgG2 par les cellules B [152, 153]. Comme dans l'étude de Hu et *al.*, nous observons une surexpression d'autres gènes impliqués dans la réponse Th17. On retrouve notamment des gènes impliqués dans l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> médiée par l'IL-17 comme le gène codant pour l'IL $\beta$ -1 (*IL1B*) ou le G-CSF (*CSF3*) ainsi que des gènes relatifs à la famille de l'IL-6 comme l'oncostatine M (*OSM*) ou le facteur de transcription *CEBPB*. Alors que l'ensemble des gènes ne sont pas surexprimés de manière différentielle entre accès simples et accès graves, l'expression du gène codant pour le G-CSF est augmentée uniquement chez les accès graves tout comme le produit de ce gène dans le plasma de ces patients. De plus, des gènes impliqués dans l'activation des neutrophiles comme *S100A8*, *S100A9*, *ICAM-1*, *ITGB2*, ou *ELANE* (gène codant pour l'élastase, enzyme exprimée dans les neutrophiles), et dans l'activation du complément comme *C3AR1*, *CQ1A*, *CQ1B* sont également surexprimés. Les gènes *ELANE* et *CQ1B* n'étaient pas mentionnés dans l'étude de Hu et *al.* Il est à noter que le gène codant pour l'élastase, augmenté respectivement 1,5 fois et 2,2 fois chez les accès simples et les accès graves à J0, reste encore 2 fois plus exprimé à J7 chez les 2 groupes de patients impaludés. Il a été montré que des perturbations du contrôle de l'élastase peuvent entraîner des perturbations au niveau de la perméabilité membranaire du poumon et une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires [154]. D'ailleurs, une activation trop importante de l'immunité Th17 pourrait jouer un rôle dans les complications telles que l'atteinte cérébrale, rénale ou pulmonaire (SDRA) [155-157].

**Tableau 14. Voies métaboliques relatives à l'activité cellulaire sur-exprimées chez les individus impaludés à l'admission.**

Voies métaboliques relatives à l'activité cellulaire		
SM	P-value	Nb d'entité/Nb total
Cell cycle	2,05E-09	18/103
Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A	1,63E-07	5/7
cell division	5,57E-07	5/7
Mitotic M-M-G1 phases	3,38E-06	6/15
DNA damage response	7,13E-06	11/68
G0 and Early G1	1,10E-05	5/11
Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 comple	1,29E-05	4/6
Breakdown of the nuclear lamina	2,94E-05	3/6
CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6	2,94E-05	3/3
Regulation of PLK1 Activity at G2/M Transition	2,81E-04	3/5
Polo-like kinase mediated events	9,38E-04	3/7
Cell Cycle Checkpoint	9,42E-04	4/16
The IPAF inflammasome	9,54E-04	2/2
CDT1 association with the CDC6:ORC:origin complex	9,54E-04	2/2
p53-Independent DNA Damage Response	9,54E-04	2/2
Hs G1 to S cell cycle control WP45 45301	0,001	8/68
Cyclin A/B1 associated events during G2/M transition	0,001	3/8
The AIM2 inflammasome	0,003	2/3
G2/M DNA damage checkpoint	0,003	2/5
The NLRP3 inflammasome	0,003	3/10
Mitotic G2-G2-M phases	0,003	3/10
Mitotic G1-G1-S phases	0,004	3/11
Proteasome Degradation	0,012	6/65
Degradation of collagen	0,030	2/9
APC-Cdc20 mediated degradation of Nek2A	0,031	1/1
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin	0,031	1/1
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Cyclin B	0,031	1/1
Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	0,031	1/1
<b>UM</b>		
Cell cycle	0	15/103
Synthesis and interconversion of nucleotide di- and triphosphates	6,34E-10	6/9
Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 comple	5,83E-07	4/6
Activation of ATR in response to replication stress	1,34E-06	4/7
CDK-mediated phosphorylation and removal of Cdc6	2,82E-06	3/3
APC-C-mediated degradation of cell cycle proteins	7,80E-06	4/10
The NLRP3 inflammasome	7,80E-06	/10
Phagosomal maturation (early endosomal stage)	1,12E-05	3/4
G0 and Early G1	1,21E-05	4/11
Mitotic M-M-G1 phases	4,79E-05	4/15
DNA damage response	5,03E-05	7/68
Activation of Matrix Metalloproteinases	5,13E-05	6/47
Cyclin A/B1 associated events during G2/M transition	1,50E-04	3/8
Separation of Sister Chromatids	1,50E-04	3/8
CDT1 association with the CDC6:ORC:origin complex	2,00E-04	2/2

L'activation des TLRs via l'induction de NF- $\kappa$ B, augmente l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Parmi ces cytokines, nous retrouvons dans notre étude une surexpression des gènes codant pour le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ . Ceci est en adéquation avec l'augmentation du TNF- $\alpha$  et de l'IL-1 $\beta$  plasmatiques chez les patients impaludés trouvée lors de l'analyse immunologique. A la différence de Hu et *al.*, nous observons également une surexpression de certains gènes impliqués dans l'activation des monocytes/macrophages. Le gène codant pour MCP-1 (*CCL2*), chimiokine attractrice des monocytes et des basophiles, est surexprimé chez les accès graves (1,8) alors qu'il est sous-exprimé chez les accès simples (-2,4). Son récepteur, *CCR2* est surexprimé dans les 2 groupes de patients impaludés (respectivement 4,2 et 2,7). Dans l'analyse immunologique, MCP-1 est retrouvé significativement augmenté chez ces 2 groupes de patients avec une concentration supérieure chez les accès graves. La plupart de nos patients étant infectés depuis au moins deux semaines, il se peut que la phase de recrutement des macrophages (induction précoce) sur le lieu de l'infection par MCP-1 notamment, soit stabilisée au moment du prélèvement, expliquant les différences d'expression entre le gène et son produit pour les accès simples.

Des gènes codant pour les récepteurs exprimés à la surface des monocytes/macrophages activés comme *CD14* et *CD163* (impliqué dans la clairance et l'endocytose des complexes hémoglobine/haptoglobine par les macrophages) sont légèrement plus exprimés dans les accès graves (1,8 et 2,4 respectivement) que dans les accès simples (1,2 et 1,5 respectivement). Le produit du gène *CD163*, qu'il soit ancré dans la membrane ou sous forme soluble, peut avoir un effet anti-inflammatoire soit par l'activation de l'expression de l'IL-10 et de l'hème oxydase (HO-1) soit directement en inhibant la synthèse de phorbol-ester des lymphocytes T pour la forme soluble [158-160]. Dans le cadre de l'accès palustre, l'activité de ce récepteur n'est pas bien définie. Kusi et *al.* ont mesuré une augmentation de la forme soluble aussi bien dans l'accès palustre simple, cérébral que dans l'anémie sévère, avec un taux supérieur chez les accès simples (11,9  $\mu$ g/ml vs 7,7  $\mu$ g/ml et 8,0  $\mu$ g/ml) [161]. Ces résultats semblent différents dans notre étude, mais l'analyse n'est pas effectuée au même niveau. Le dosage de la forme soluble dans nos échantillons pourrait permettre d'apporter une réponse. Pour Hu et *al.*, cette faible surexpression de gènes impliqués dans l'activation des monocytes dans les différents groupes d'accès palustre serait en relation avec une réponse Th1 mixte, majoritairement dirigée par les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  et dans une moindre mesure par la voie de l'IL-12 [143]. Nous ne retrouvons pas, comme Hu et *al.*, les gènes *IL12RB1*, *STAT4* et *TNFSF11* différenciellement exprimés chez les patients impaludés par rapport aux témoins. De plus, notre analyse montre une faible activation des gènes codant pour l'IL-3, le M-CSF et le GM-CSF, ainsi qu'une absence de GM-CSF plasmatique. L'augmentation de l'IL-12 dans le plasma, bien que le transcrit ne soit pas exprimé, l'augmentation plasmatique et transcriptomique de l'IL10, qui a la capacité de réprimer les

Mitotic G1-G1-S phases	4,28E-04	3/11
The AIM2 inflammasome	5,95E-04	2/3
Activation of the pre-replicative complex	5,95E-04	2/3
G2/M DNA damage checkpoint	5,95E-04	2/5
Cell Cycle Checkpoints	0,001	3/16
Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A	0,003	2/7
Regulation of DNA replication	0,004	2/7
Polo-like kinase mediated events	0,004	2/7
cell division	0,004	2/7
Mitotic G2-G2-M phases	0,008	2/10
Synthesis of DNA	0,012	2/13
APC-Cdc20 mediated degradation of Nek2A	0,014	1/1
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin	0,014	1/1
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Cyclin B	0,014	1/1
SCF(Skp2)-mediated degradation of p27/p21	0,014	1/1
Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	0,014	1/1
DNA Replication	0,022	3/42
The IPAF inflammasome	0,028	1/2

---

macrophages, tout comme l'augmentation du gène codant pour l'un de ses effecteurs, *HMOX1* (HO-1), seraient également en faveur d'une faible activation des monocytes/macrophages. Il est à noter que l'IL-10 a également la capacité d'activer les cellules NK et d'induire la réponse Th2 par l'inhibition des effecteurs de la réponse Th1. Comme dans l'étude de Hu et *al.*, nous n'observons pas de forte participation de la réponse de type Th2. Les gènes *IL10* et *HMOX1* sont sous-exprimés à J7.

D'autres récepteurs de surface comme le *CD36* (récepteur de la thrombospondine exprimé à la surface des plaquettes et autres lignées cellulaires avec lequel *P. falciparum* peut interagir) sont surexprimés chez les patients impaludés en particulier chez les accès graves (4 fois versus 2 fois chez les accès simples).

A côté des récepteurs situés en surface des cellules comme les TLRs impliqués dans la reconnaissance des motifs moléculaires étrangers on trouve des récepteurs cytoplasmiques comme les récepteurs NOD (NOD Like Receptor ou NLR) ayant des fonctions identiques. Des gènes comme *ASCC1* (ou *ASC*), *ADF*, *P2X7* et *CASP1* impliqués dans la cascade de signalisation des inflammasomes, complexes protéiques impliqués dans l'immunité innée, sont retrouvés surexprimés dans notre étude. L'inflammasome, retrouvé dans les cellules phagocytaires est formé par des protéines NLR, secondaire à la reconnaissance de divers signaux inflammatoires et plus particulièrement de ceux provenant d'agents pathogènes. Ils favorisent la maturation de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 $\beta$  et l'IL-18, en les clivant par la caspase 1 (*CASP1*) [162]. Nous avons ci-dessus rapporté une surexpression du gène codant pour l'IL-1 $\beta$  chez les patients impaludés. Elle est associée à une surexpression des gènes *IL18RAP* et *IL18R1*, sous-unités du récepteur de l'IL18, impliqués dans la synthèse de cette cytokine par la voie NF- $\kappa$ B. Cette surexpression est présente dans les accès simples (respectivement 1,9 et 1,5 fois) et graves (respectivement 2,5 et 2,9 fois). Griffiths et *al.* et très récemment Idaghdour et *al.* ont également mis en évidence une surexpression de l'*IL18R1* (2,8 fois dans la seconde étude) en relation avec l'activité des neutrophiles chez des enfants impaludés [147, 148]. Ockenhouse et *al.*, ont également mis en évidence l'activation d'un complexe inflammasome (NLRP3), par l'expression des gènes *NALP3*, *CASP1* et *ASC* en association avec le contrôle de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  [145]. L'activation de ces complexes a récemment été mise en relation avec le phénomène d'opsonisation des parasites par les monocytes/macrophages, et plus particulièrement par la libération d'hémozoïne qui va induire une forte induction de l'IL-1 $\beta$  [163, 164]. Ces complexes étant retrouvés dans les macrophages, ils peuvent contribuer à l'élimination des formes parasitaires séquestrées dans les organes profonds, contenant de plus fortes concentrations d'hémozoïne. A J7, tous ces gènes ne sont plus différentiellement exprimés par rapport aux témoins, voire légèrement sous-exprimés.

**Tableau 15. Voies métaboliques relatives à la dégradation des protéines sur-exprimées chez les individus impaludés à l'admission.**

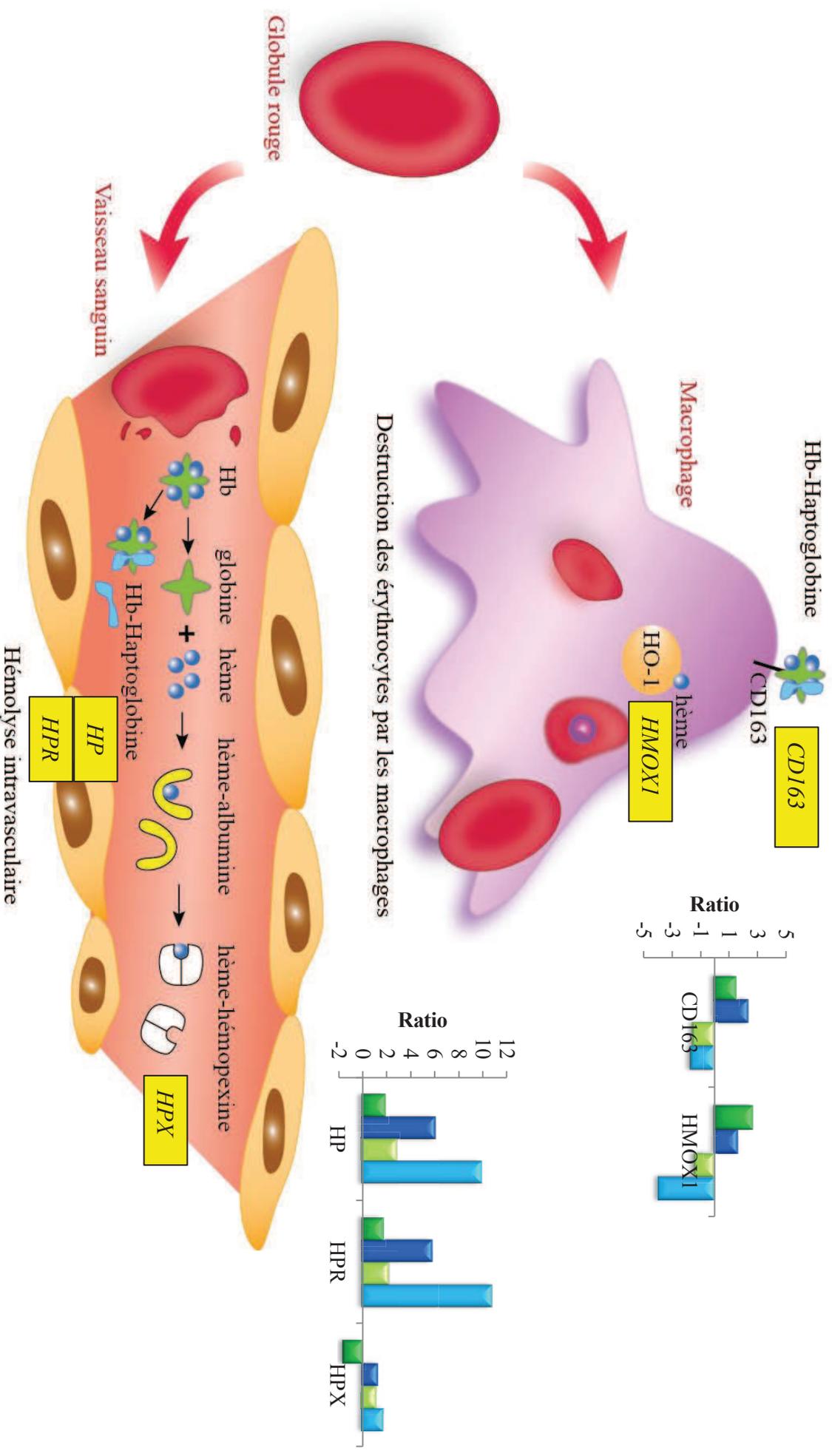
Voies métaboliques relatives à l'immunité		
SM	P-value	Nb d'entité/Nb total
Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A	1,63E-07	5/7
Breakdown of the nuclear lamina	2,94E-05	3/6
The IPAF inflammasome	9,54E-04	2/2
The AIM2 inflammasome	0,003	2/3
The NLRP3 inflammasome	0,003	3/10
Proteasome Degradation	0,012	6/65
Degradation of collagen	0,030	2/9
APC-Cdc20 mediated degradation of Nek2A	0,031	1/1
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin	0,031	1/1
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Cyclin B	0,031	1/1
Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	0,031	1/1
<b>UM</b>		
APC-C-mediated degradation of cell cycle proteins	7,80E-06	4/10
The NLRP3 inflammasome	7,80E-06	3/10
Phagosomal maturation (early endosomal stage)	1,12E-05	3/4
The AIM2 inflammasome	5,95E-04	2/3
Ubiquitin Mediated Degradation of Phosphorylated Cdc25A	0,003	2/7
APC-Cdc20 mediated degradation of Nek2A	0,014	1/1
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Securin	0,014	1/1
APC/C:Cdc20 mediated degradation of Cyclin B	0,014	1/1
SCF(Skp2)-mediated degradation of p27/p21	0,014	1/1
Cdc20:Phospho-APC/C mediated degradation of Cyclin A	0,014	1/1
The IPAF inflammasome	0,028	1/2

Parallèlement à l'activation des familles de gènes impliquées dans la formation de l'inflammasome, nous relevons dans l'étude de nos résultats une surexpression des gènes impliqués dans l'ubiquitination et la phagocytose. Le marquage de protéines par l'ubiquitine permet son transfert vers le protéasome, lieu de dégradation des protéines membranaires comme celles des cellules érythrocytaires parasitées.

La croissance et la multiplication parasitaire nécessitent une considérable quantité d'acides aminés que le parasite prélève en partie lors de la dégradation de l'hémoglobine de l'hôte. La destruction de cette dernière devrait induire une activation des voies de synthèse de l'hémoglobine. C'est ce que nous observons à J0, notamment chez les accès simples, avec des gènes codant pour l'hémoglobine tels *HBA2*, *HBD* et *HBG1*, à la différence de Hu et *al.* qui les trouvent sous-exprimés [144]. A J7, nous observons principalement une surexpression des gènes associés dans la synthèse de l'hème et dans le transport de l'oxygène. Ces gènes ainsi que des gènes codant pour des protéines stabilisatrices de l'hémoglobine comme *AHSP* sont en moyenne 2 à 3 fois plus exprimés à J7 dans notre étude, quel que soit le groupe impaludé, excepté le gène codant pour l'hémoglobine beta (*HBB*) qui est réprimé. Griffiths et *al.* mettent également en évidence une activation d'un panel de gènes en relation avec l'activité érythrocytaire dans son étude comparative entre des enfants impaludés et convalescents dès J0 [147]. Un certain nombre de ces gènes sont retrouvés fortement surexprimés à J7 dans notre étude comme les gènes *PLEK2*, *TMCC2*, *BNIP3L*, *HMBS* et *TMOD1*, quel que soit le niveau de gravité à la différence de leur expression à J0. En effet dans les accès graves ces gènes sont peu voir pas du tout surexprimés à J0. La réponse observée chez les accès simples dans notre étude va dans le sens des résultat de Griffiths et *al.*, avec une accentuation de cette activité à J7. L'absence de mise en évidence de la réponse hématopoïétique dans les accès graves pourrait s'expliquer par une réponse inflammatoire majeure avec une sidération de la reprise hématopoïétique à J0.

L'infection palustre, lors de la maturation du parasite, entraîne une production de ferriprotoporphyrine IX, composé toxique pour le parasite et l'hôte, liée à la digestion de l'hémoglobine, ainsi qu'une libération d'hémoglobine et d'hémozoïne lors de la lyse des hématies à la libération des mérozoïtes. L'hémoglobine libérée est prise en charge par l'haptoglobine et l'hémopexine, glycoprotéines synthétisées par le foie et dont l'induction est influencée par l'inflammation. Le complexe hémoglobine-haptoglobine est rapidement dégradé par le système réticulo-endothélial hépatique permettant la récupération du fer et la dégradation de l'hémoglobine en bilirubine. L'hémopexine possède une très forte affinité pour l'hème et intervient en seconde intention dans la clairance de celle-ci, après intervention de l'haptoglobine. Cette action repose sur l'induction de l'expression intracellulaire de protéines

Figure 7 : Voie de dégradation de l'hémoglobine chez les patients avec accès palustres simples et graves.



Rectangles jaunes : gènes surexprimés chez les patients impaludés

Graphiques : représentation des ratios des gènes chez les patients impaludés par rapport aux témoins. Vert foncé : AS à J0; vert clair : AS à J7; bleu foncé : AG à J0 et bleu clair : AG à J7.

antioxydantes et protectrices (HO-1, MT-1, ferritine) par le complexe hème-hémopexine dans les cellules exprimant le récepteur pour l'hémopexine [165, 166]. À l'état ferreux ou ferrique, le fer de l'hème peut entraîner des lésions en s'intercalant aux lipides des membranes (membranes cellulaires et autres structures lipophiles comme les LDL), et en catalysant la production de radicaux hydroxyles toxiques [167]. Au niveau systémique, le rôle essentiel de l'hémopexine est d'empêcher les mécanismes oxydatifs et pro-inflammatoires de l'hème libre vis-à-vis des cellules n'exprimant pas de récepteur à l'hémopexine en séquestrant l'hème qui possède des propriétés pro-oxydantes [168].

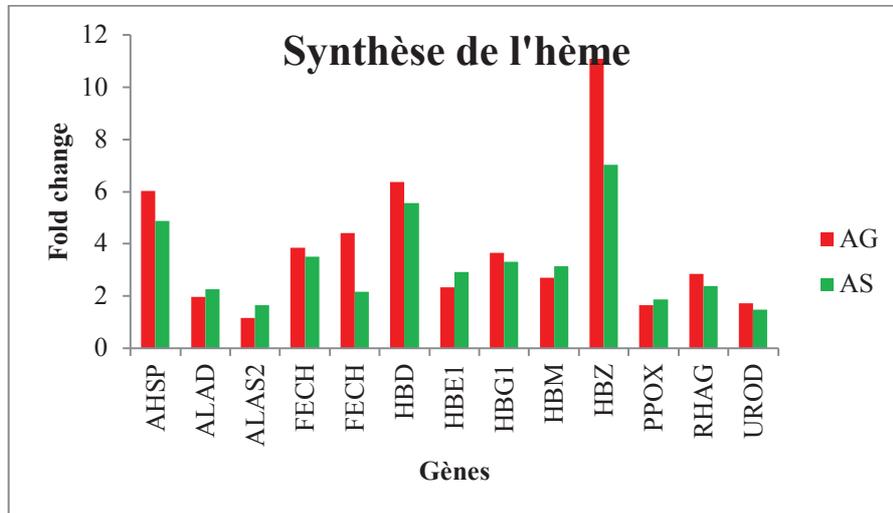
Dans notre étude nous observons une surexpression des gènes codant pour l'haptoglobine (*HP* et *HPR*) et l'hémopexine (*HPX*) dès J0 chez les patients impaludés, notamment chez les accès graves et en moyenne deux fois plus exprimés à J7 aussi bien chez les accès simples que graves. Aucune des études publiées précédemment n'a mis en évidence l'implication de ces gènes au cours de l'accès palustre. Pour le gène *HMOX1*, surexprimé à J0, nous observons une sous-expression à J7, probablement en rapport avec l'élimination des parasites, particulièrement pour les accès simples (dosage de *PfHRP2* et *PfLDH* négatifs à J7 pour tous les accès simples).

Récemment a été évoquée une susceptibilité infectieuse à des procaryotes. Cunnington et *al.* ont récemment investigué la susceptibilité à *Salmonella* au cours de l'infection palustre [169, 170]. Au cours de ces études, il a été suggéré que l'induction de l'hème oxydase (HO-1), cytoprotecteur de l'hème et la libération de l'hème au cours de l'hémolyse induite par le parasite induisait un dysfonctionnement des neutrophiles, conférant une tolérance à l'infection à *Salmonella*. Ce dysfonctionnement serait dû à une induction précoce de HO-1 (à cause d'une hémolyse et/ou de l'infection palustre), aux premiers stades du développement des granulocytes, altérant ainsi la maturation fonctionnelle de ces cellules. Au cours de notre étude nous n'avons pu explorer cette complication du fait, et fort heureusement, que tous les accès palustres ont eu une issue favorable sous traitement.

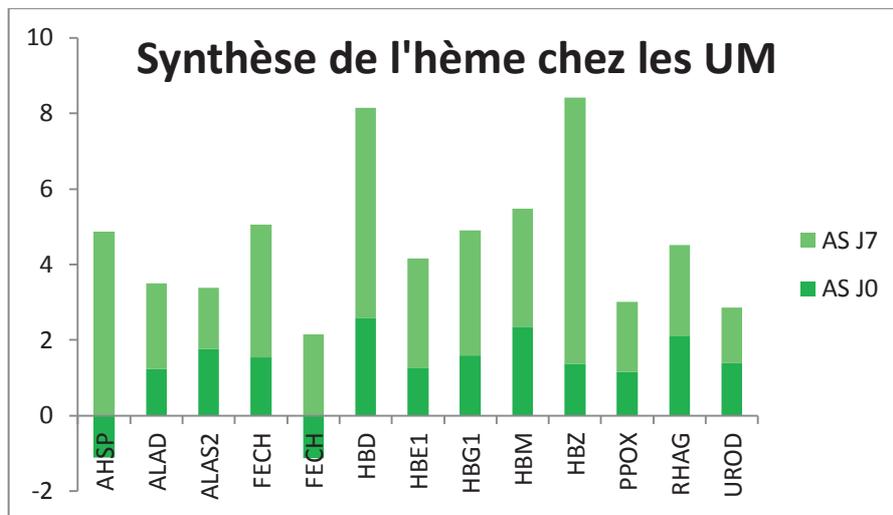
A J30, la résolution de l'infection palustre (absence de signes cliniques, parasitémie négative, absence de protéine *PfHRP2* et de LDH) se traduit par un retour à la normale de l'ensemble des gènes hormis des gènes impliqués dans l'activité cellulaire générale. Ces résultats sont corrélés à ceux obtenus sur le plan immunologique avec les cytokines pro-inflammatoires qui sont dans l'ensemble revenues à la normale.

Au cours de cette étude, nous avons pu observer une activation de nombreux gènes impliqués dans la réponse neutrophile, associée aux gènes de la voie Th17, avec une mise en lumière de l'implication de nouveaux gènes comme le *CD177* ainsi qu'une activation de nombreux gènes associés à l'activité érythropoïétique comme l'haptoglobine et l'hémopexine au cours de la

**Figure 6.** Comparaison de la modulation des gènes à J7 en comparaison de leur expression à J0 chez les accès simples (AS) et les accès graves (AG). Le fold change des gènes correspond à la différence d'expression des gènes chez les AS et les AG à J7 par rapport à J0.



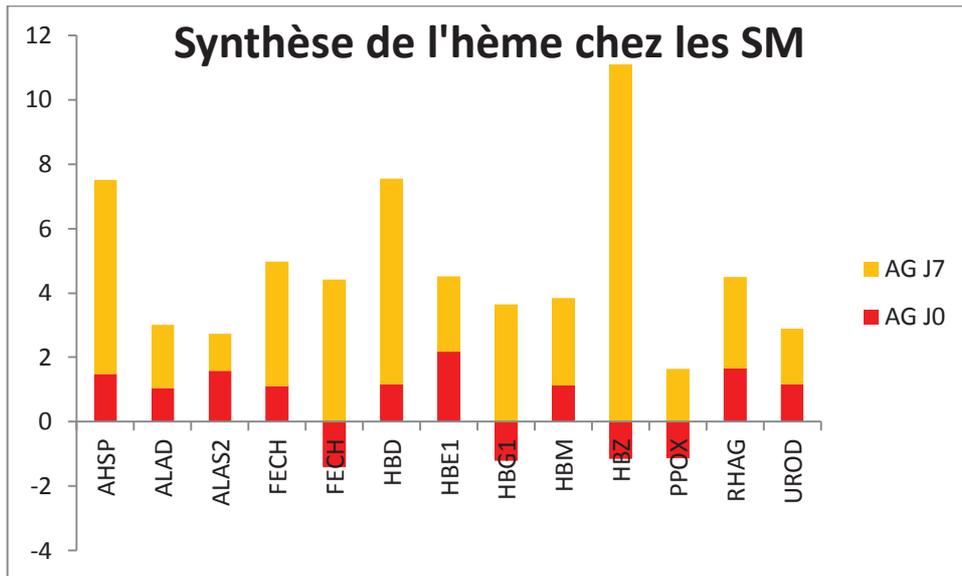
Panel A. Gènes impliqués dans la synthèse de l'hème à J7.



Panel B. Comparaison de l'expression des gènes impliqués dans l'hème à J0 et à J7 chez les AS.

résolution de la maladie. Tous nos patients ayant eu une résolution favorable à l'infection palustre, nous n'avons pu mettre en évidence des marqueurs biologiques d'aggravation de la pathologie.

Cette analyse est une analyse préliminaire qui demande à être complétée par un nombre plus conséquent de patients et une analyse plus approfondie des mécanismes abordés ici pour identifier des profils caractéristiques des différents niveaux de gravité.



Panel C. Comparaison de l'expression des gènes impliqués dans l'hème à J0 et à J7 chez les AS.

*Conclusions*  
*et*  
*perspectives*

## Conclusions et perspectives

La mesure de biomarqueurs dans le sang peut fournir des informations importantes dans la physiopathologie de la maladie, son diagnostic et son pronostic. Des réponses pro-inflammatoires exacerbées sont caractéristiques d'un accès palustre grave. D'ailleurs une activation excessive du système immunitaire est centrale dans la pathophysiologie du paludisme cérébral et placentaire. Le paludisme sévère à *P. falciparum* est classiquement caractérisé par une cytoadhérence des hématies parasitées au niveau de la microvasculature, une altération de la perfusion des tissus, une dérégulation de la réponse inflammatoire et une activation des cellules mononucléaires et de l'endothélium. Malgré la disponibilité et l'efficacité des antipaludiques actuels, le taux de mortalité lors d'un accès grave reste élevé.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à identifier des marqueurs pronostic de la sévérité de l'accès palustre dû à *P. falciparum* et de l'évolution de cet accès palustre, afin de mieux caractériser la réponse inflammatoire en fonction de la gravité de l'accès palustre.

Nous avons mené une étude prospective longitudinale chez des patients infectés par *Plasmodium falciparum* en zone d'holoendémie. Le recrutement des patients a été conduit entre 2010 et 2012 à l'hôpital de Monkole situé à Kinshasa, en République Démocratique du Congo, en Afrique. L'objectif premier de cette étude était de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement d'une atteinte pulmonaire au cours de l'accès palustre aussi bien chez des patients présentant un accès palustre simple que compliqué. Cependant, devant le peu de patients présentant des atteintes pulmonaires recrutés jusqu'à présent, nous nous sommes focalisés sur les mécanismes immunologiques impliqués dans la sévérité du paludisme au sens large, avec un parallèle sur les tendances observées chez les patients impaludés avec atteinte pulmonaire associée.

Nous avons comparé les profils immunologiques et transcriptomiques de 94 patients (sélectionnés à partir de 145 patients) âgés de plus de 12 ans. Ils ont été classés en cinq catégories : (1) 25 Témoins (T) recrutés à l'hôpital Monkole parmi les patients présents pour leur visite médicale annuelle du travail ; (2) 44 patients présentant un accès simple à *P. falciparum* (AS), d'après les critères de l'OMS [171]; (3) 10 patients présentant un paludisme grave (AG) (sujet avec  $\geq 1$  signe de gravité selon les critères de l'OMS); (4) 4 patients impaludés présentant une atteinte pulmonaire associée, en absence d'autres symptômes de gravité (AP); et (5) 11 patients présentant une infection pulmonaire sans infection palustre (P), sélectionnés à partir de 145 patients. Excepté les témoins, tous ces patients ont été suivis pendant 30 jours, avec une visite de contrôle à J7 et J30, afin d'évaluer l'évolution de la réponse immunologique induite

au cours de la maladie. La comparaison de ces patients à des témoins, exempts d'infection plasmodiale et de tout autre signe clinique d'infection a permis d'évaluer la réponse immunologique basale de cette population. La comparaison de cette réponse immunologique à celle de patients présentant une pneumopathie seule a été effectuée afin d'évaluer la modulation de celle-ci entre différentes pathologies pour une même population et surtout celle du groupe AP.

Nous avons, dans un premier temps, évalué la charge parasitaire chez les patients impaludés à partir du dosage plasmatique de *PfHRP2*, en raison d'un phénomène de séquestration présent lors d'une infection palustre à *P. falciparum* qui ne permet pas avec la parasitémie d'évaluer réellement le niveau de l'infection palustre. Un modèle mathématique a été développé par Dondorp et *al.* afin d'estimer la biomasse parasitaire totale à partir de la concentration plasmatique d'*HRP2* sécrétée par les parasites et libérée lors de l'éclatement des hématies parasitées [111]. Ce modèle a été validé en Asie chez des adultes thaïlandais impaludés puis confirmé chez des enfants impaludés issus de divers pays d'Afrique dont la RDC [111, 112]. Au cours de ces études, ils ont mis en évidence d'une augmentation significative du taux moyen plasmatique de *PfHRP2* chez les patients décédés d'un accès palustre en comparaison des survivants. De même, les patients présentant des signes de gravité (coma, acidose ou anémie sévère...) présentaient un taux significativement plus élevé de *PfHRP2* que ceux présentant un accès simple.

Dans notre étude, nous avons trouvé une corrélation entre la concentration plasmatique de *PfHRP2* et les différents groupes de patients classés en fonction des signes cliniques. En effet, la concentration plasmatique de *PfHRP2* était respectivement 10 et 8 fois plus élevée chez les AG et les AP que chez les AS. Ces résultats nous ont permis de valider le classement initial de nos patients en fonction de la gravité basé sur les données cliniques. A J7, il n'y avait plus de *PfHRP2* détectable chez les AS, tandis que chez les AG une faible concentration de *PfHRP2* (47 ng/ml) a été mesurée. A J30, aucune concentration de *PfHRP2* n'a été détectée, quel que soit le groupe.

L'évaluation à terme du taux de *PfHRP2* en lieu et place de l'estimation de la parasitémie permettrait, aux vues de nos résultats et des précédents, une meilleure évaluation des risques d'aggravation de l'accès palustre et une meilleure prise en charge des patients.

Grâce à l'analyse immunologique, nous avons constaté à J0 une augmentation des médiateurs sécrétés par les cellules dendritiques et les macrophages chez tous les patients impaludés (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) avec une augmentation de l'IL-6, IL-8 et de l'IL-10, comme dans la littérature (Tableau 18). Par contre, le TNF- $\alpha$  dont le rôle est considéré comme prépondérant lors de l'accès palustre, n'est ici pas différenciellement sécrété entre les AS et les AG. De même, l'INF- $\gamma$ , bien qu'augmenté chez les AS par rapport aux témoins n'est significativement augmenté que chez les

**Tableau 16. Niveau d'expression des médiateurs inflammatoires à J0.**

Médiateurs	AS	AG	AP	P		
IL-4	+	+	+	+		
IL-13	+	+	+	+		
IL-1 $\beta$	+	+	+	+		
IL-12	+	+	+	+	} <b>Activité CD4 et/ou macrophages</b>	
TNF- $\alpha$	+	+	+	-		
IL-6	+	++	++	+		
IL-8	+	++	++	+		
MCP-1	+	++	++	-		
MIP-1 $\beta$	+	++	++	-	} <b>Activation neutrophiles</b>	
IL-10	+	++	++	-		
IFN- $\gamma$	-	+	-	+		→ <b>Activité macrophages</b>
IL-17	-	+	-	-		
G-CSF	-	+	-	+		
IL-5	-	-	-	+		
IL-7	-	-	-	+		

+ : taux significativement augmentés par rapport aux témoins

- : taux non différenciellement modulés par rapport aux témoins

AS : accès palustre simple; AG : accès palustre grave; AP; accès palustre avec atteinte pulmonaire associée et P: pneumopathie seule

En vert : les médiateurs inflammatoires communément retrouvés dans les deux types de pathologies (paludisme et pneumopathie)

En jaune : médiateurs significativement et spécifiquement augmentés chez les patients impaludés

En orange : médiateurs significativement et spécifiquement augmentés chez les patients avec accès palustre grave

En bleu : médiateurs significativement et spécifiquement augmentés chez les patients avec pneumopathie seule

AG. Ces patients résidant en zone d'holoendémie, il est probable que leur contact permanent avec le parasite ait un impact sur le taux de ces cytokines pro-inflammatoires comme mentionné précédemment [89]. En plus de ces données, nous avons observé une sécrétion de médiateurs impliqués dans l'activation et le recrutement de neutrophiles chez les patients impaludés, avec une exacerbation de la réponse neutrophile chez les AG par l'augmentation de l'IL-6 et des chimiokines IL-8, MCP-1 et MIP-1 $\beta$ , associée à une sécrétion d'IL-17 et de G-CSF spécifiquement chez les AG. Les patients appartenant au groupe AP présente un profil similaire à celui des AG. La réponse neutrophile a jusqu'à présent été peu investiguée dans la réponse à l'infection palustre, se limitant à des anciennes publications relatant des effets délétères lors du paludisme cérébral notamment [172, 173]. Une légère augmentation de plusieurs effecteurs impliqués dans l'activation de la réponse humorale (IL-4 et IL-13) est également observée à l'admission, favorisée par une forte sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire de la réponse Th1, l'IL-10. La majorité des patients ayant des signes d'infection depuis au moins deux semaines lors de leur première consultation, il se peut que les cytokines de la réponse Th1 commencent à diminuer en faveur de la mise en place d'une réponse Th2.

Les patients présentant une pneumopathie simple ont un profil inflammatoire différent des patients impaludés car ils n'expriment pas d'IL-10, de TNF- $\alpha$ , de MCP-1 MIP-1 $\beta$  et d'IL-17. Par contre, ils expriment de l'IL-5 et de l'IL-7 spécifiquement, comme on peut le voir dans le tableau récapitulatif (Tableau 18). L'implication de MCP-1 MIP-1 $\beta$ , de l'IL-17 et du G-CSF lors d'un accès palustre, qui semblent associés à la gravité de la maladie n'avaient jusqu'à présent pas ou peu été mis en évidence chez l'adulte.

Le suivi des patients à J7 et J30 nous a permis de constater que tous les patients ont guéris. A J7, un comportement similaire des médiateurs inflammatoires est observé chez tous les patients impaludés (AS, AG et AP) avec un retour à la normale des médiateurs inflammatoires impliqués dans le recrutement des neutrophiles (MCP-1 MIP-1 $\beta$ , IL-8, IL-17 et G-CSF) et une baisse des médiateurs impliqués dans l'inflammation dite aigue (IL-6 et IL-10). Par contre, nous observons un maintien de l'immunité cellulaire (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 et TNF- $\alpha$ ) ainsi qu'une légère expression de l'immunité humorale (IL-4, IL-5 et IL-13).

A J30, nous avons observé chez les accès palustres simples un maintien stable de l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-12 et de l'IL-13 par rapport à J7 qui pourrait refléter le maintien d'une immunité cellulaire, ce qui n'est pas observé chez les accès palustres graves, pour lesquels tous les médiateurs inflammatoires sont revenus à la normale.

Nous ignorons à ce stade si le maintien élevé de ces médiateurs à J30 a un effet protecteur ou délétère au cours d'une prochaine infection palustre. Pour le déterminer, il serait intéressant de

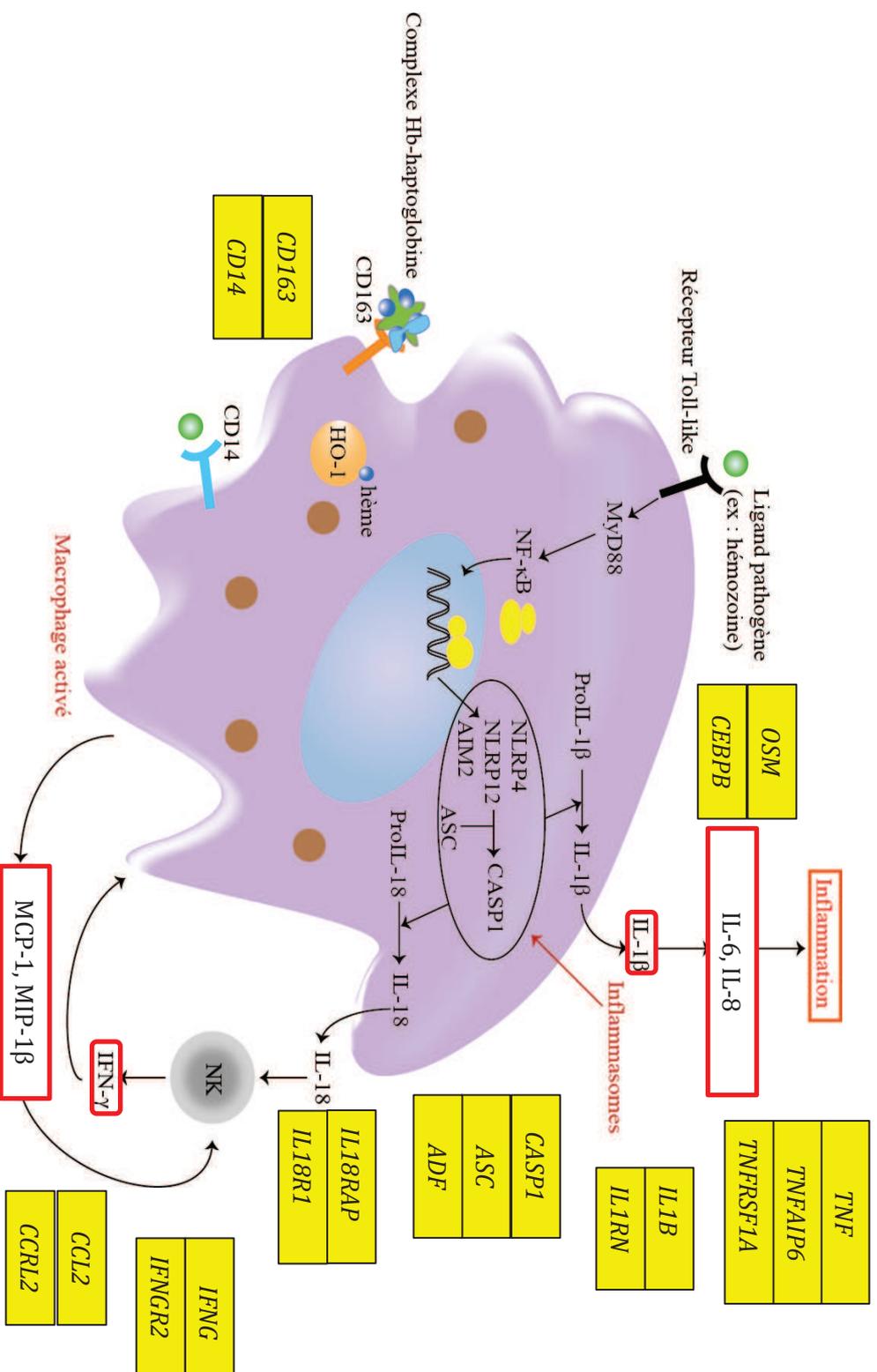
suivre des patients impaludés sur deux infections palustres afin d'évaluer la signification de ces taux élevés de médiateurs inflammatoires.

Afin de compléter les résultats obtenus dans l'étude immunologique et d'affiner leur compréhension, nous avons étudié le profil transcriptomique chez ces même patients. Tout d'abord, l'étude du transcriptome a été réalisée sur l'ensemble des cellules nucléées du sang veineux, nous permettant de limiter au maximum le stress des cellules dû aux différentes manipulations de façon à ce que les variations observées ne soient dues qu'à la pathologie étudiée.

Cette étude nous a permis de mieux caractériser la réponse inflammatoire observée lors de l'étude immunologique. Nous avons pu observer une activation de nombreux gènes impliqués dans la réponse neutrophile, associée aux gènes de la voie Th17 (*IL17B*, *IL17C*, *IL17RA* et *IL17RB*) ainsi que des gènes impliqués dans la stimulation de cette voie comme le gène codant pour l'IL $\beta$ -1 (*IL1B*) ou le G-CSF (*CSF3*) ainsi que des gènes relatifs à la famille de l'IL-6 comme l'oncostatine M (*OSM*). Nous avons également mis en lumière l'implication de nouveaux gènes comme *CD177* (gène codant pour cette glycoprotéine, exprimée spécifiquement à la surface des neutrophiles qui interagit avec les récepteurs endothéliaux de l'hôte tel que PECAM-1) ou *ELANE* (gène codant pour l'élastase, enzyme exprimée dans les neutrophiles qui peut intervenir au niveau tissulaire mais également dans la lyse d'éléments pathogènes) qui sont fortement exprimés chez les accès palustres graves. Cette voie, illustrée en figure 8, est particulièrement importante dans la phagocytose et la lyse des parasites, notamment au niveau des organes profonds lors de la séquestration et dans la destruction de tissus lésés au cours de l'inflammation.

Des gènes impliqués dans la voie classique de l'activation du complément dont *CQ1B* qui n'a pas été mis en évidence jusqu'à présent ont également été retrouvés surexprimés chez les patients impaludés. Cette voie, à l'interface de l'immunité innée et acquise, permet la lyse directe de éléments infectieux, stimule l'inflammation et l'opsonisation d'agent pathogènes et permet le recrutement des cellules phagocytaires et de lymphocytes B sur le site d'infection. Le rôle de cette voie a surtout été montré lors d'infections bactériennes et très récemment au cours de l'infection palustre et notamment lors du paludisme cérébral et placentaire [126, 127]. En parallèle, nous avons pu associer l'activation modérée du gène codant pour l'IFN- $\gamma$  et des gènes associés à la voie de signalisation de celui-ci chez les accès simples et les accès graves, bien qu'elle soit plus marquée chez les accès graves avec une activation modérée des gènes codant pour le recrutement et l'activation des monocytes/macrophages. Associée à l'activité macrophagique, une activation des inflammasomes, complexes protéiques impliqués dans l'immunité innée, a été trouvée comme on peut le voir sur le schéma récapitulatif (figure 9).

Figure 9 : Schéma récapitulatif de l'activité des macrophages chez les patients avec accès palustres simples et graves d'après l'analyse combinée d'immunologie et de transcriptomique.



Rectangles avec fond jaune : gènes surexprimés chez les patients imparaludés

Rectangles rouges : médiateurs inflammatoires significativement augmentés chez les patients imparaludés

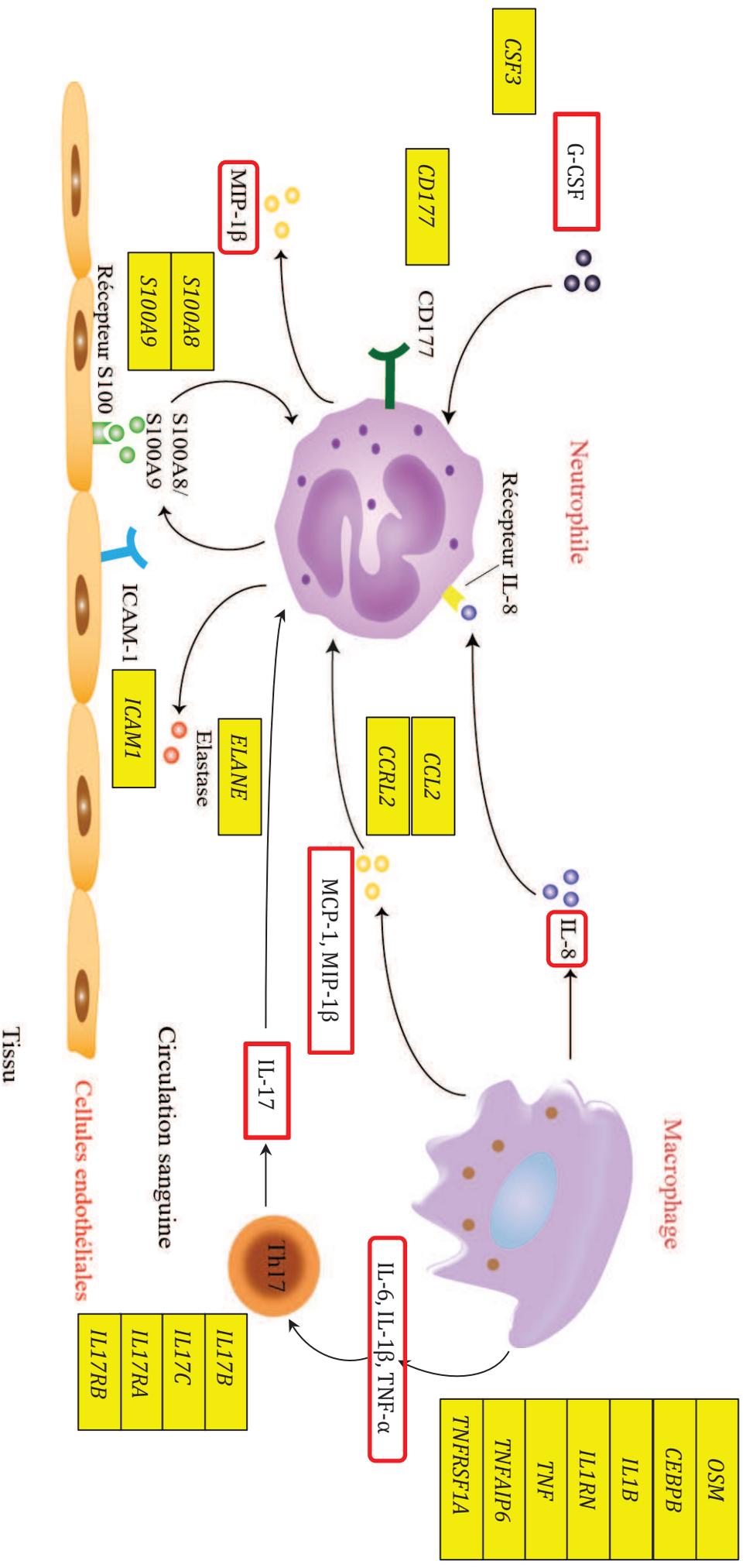
L'activation de ces complexes a récemment été mise en relation avec le phénomène d'opsonisation des parasites par les monocytes/macrophages, et plus particulièrement par la libération d'hémozoïne qui va induire une forte induction de l'IL-1 $\beta$  [164, 165]. Ces complexes étant retrouvés dans les macrophages, ils peuvent contribuer à l'élimination des formes parasitaires séquestrées dans les organes profonds, contenant de plus fortes concentrations d'hémozoïne. Une surexpression des gènes impliqués dans l'ubiquitination et la phagocytose, impliqué dans la dégradation des protéines membranaires comme celles des cellules érythrocytaires parasitées a également été observée. D'ailleurs une activation de nombreux gènes associés à l'activité érythropoïétique comme l'haptoglobine (*HP* et *HPR*) et l'hémopexine (*HPX*) ont également été observés au cours de la résolution de la maladie. Une expression plus élevée de cette voie chez les AG est à mettre en relation avec la charge parasitaire 10 fois plus élevée chez les AG et relate vraisemblablement une hémolyse plus importante chez ces patients. Aucune des études publiées précédemment n'a mis en évidence l'implication de ces gènes au cours de l'accès palustre. Ceci peut s'expliquer par le fait que les études précédentes ne s'étaient pas intéressées aux événements survenant lors de la résolution de la maladie.

A J30, la résolution de l'infection palustre (absence de signes cliniques, parasitémie négative, absence de protéine *PfHRP2* et de *LDH*) se traduit par un retour à la normale de l'ensemble des gènes impliqués au cours de la phase aigüe. Par contre, des gènes impliqués dans l'activité cellulaire générale sont encore surexprimés chez les patients impaludés par rapport aux contrôles. Il semble donc que les taux légèrement plus élevés de cytokines pro-inflammatoires observées dans l'étude immunologique à J30 ne soient pas liées à un phénomène inflammatoire mais plutôt à une activité réparatrice.

Tous nos patients ayant eu une résolution favorable à l'infection palustre, nous n'avons pu mettre en évidence des marqueurs biologiques d'aggravation de la pathologie au cours de ce travail. Cependant nous avons pu observer une concordance entre les médiateurs inflammatoires augmentés chez les patients impaludés et leurs transcrits dans notre étude. Nous avons également observé un certain nombre de médiateurs inflammatoires et de gènes qui pourraient être observés afin de déterminer le niveau de gravité de l'accès palustre comme *MCP-1*, *MIP-1 $\beta$* , l'IL-17, le G-CSF, le gène codant pour l'élastase (*ELANE*) ou encore le gène codant pour le récepteur situé sur la membrane des neutrophiles *CD177* (*CD177*).

Cette analyse doit être confortée par une augmentation de la cohorte, notamment des patients impaludés avec une atteinte pulmonaire associée. D'ailleurs le recrutement continu actuellement à l'hôpital de Monkole, à Kinshasa (RDC).

Figure 8 : Schéma récapitulatif de l'activité des neutrophiles chez les patients avec accès palustres simples et graves d'après l'analyse combinée d'immunologie et de transcriptomique.



Rectangles avec fond jaune : gènes surexprimés chez les patients imparaludés

Rectangles rouges : médiateurs inflammatoires significativement augmentés chez les patients imparaludés

L'étude de patients présentant une aggravation de l'accès palustre au cours du suivi pourrait nous permettre de déterminer si les acteurs identifiés au cours de cette étude appartiennent à des mécanismes protecteurs, favorables à la résolution de la maladie ou si une expression excessive peut être délétère pour le patient. En effet, il a été montré que des perturbations du contrôle de l'élastase peuvent entraîner des perturbations au niveau de la perméabilité membranaire du poumon et une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires [154]. Une activation trop importante de l'immunité Th17 pourrait également jouer un rôle dans les complications telles que l'atteinte cérébrale, rénale ou pulmonaire (SDRA) [155-157]. La réponse neutrophile associée à la réponse Th17 n'a pour l'instant pas été réellement investiguée au cours de l'accès palustre, bien qu'elle semble avoir un rôle important dans la réponse inflammatoire mise en place chez nos patients. Il nous paraît donc important d'investiguer davantage son rôle avec des patients supplémentaires.

La technique de prélèvement utilisée va également nous permettre d'analyser simultanément le profil d'expression parasitaire à celui de nos patients afin d'identifier des mécanismes associés à la virulence de certains isolats de *P. falciparum*, dont ceux impliqués dans la cytoadhérence. Il a été montré précédemment que les différences cliniques observées chez des patients pouvaient être associées à différents stades physiologiques du parasite [174]. Si nous pouvions réussir à associer ces observations avec les résultats de nos patients, nous pourrions mieux comprendre l'impact de l'expression de certains gènes plasmodiaux sur la réponse inflammatoire induite en réponse ainsi que les mécanismes mis en jeu par le parasite pour échapper au système immunitaire de l'hôte.

A cela s'ajoute l'étude de la résolution de la maladie qui pourrait nous permettre de mettre en évidence des mécanismes induits par le parasite lorsque le patient présenterait une aggravation de la maladie à la place d'une résolution.

Nous avons encore l'analyse des résultats de transcriptomique à J30 à approfondir en fonction de l'évolution de chaque patient car nous n'avons fait qu'une analyse globale. Peut-être pourrions-nous également identifier des biomarqueurs correspondant à la mise en place d'une certaine immunité protectrice de l'hôte avec l'augmentation du nombre de patients.

Il a également récemment été montré que des différences au niveau allélique du gène TNF- $\alpha$  pouvait jouer un rôle dans la sévérité de la maladie par l'induction d'une plus forte sécrétion d'IL-10 avec l'allèle TNF2 chez les accès graves qu'avec l'expression de l'allèle TNF1 chez les accès simples [92]. La recherche d'éventuels marqueurs de polymorphismes alléliques chez nos

patients mais également sur les isolats les ayant infectés pourrait également apporter des renseignements supplémentaires la réponse inflammatoire mise en jeu.

Un certain nombre d'outils d'analyse ayant été mis en place dans cette étude, ils pourraient être utilisé dans une nouvelle étude clinique, portant cette fois-ci sur le paludisme d'importation afin d'évaluer la réponse neutrophiles chez ces patients et déterminer si cette réponse est spécifique aux zones d'endémie ou commune à tout accès palustre.

Il reste donc un travail énorme à effectuer sur ce sujet passionnant, mais les outils d'analyse ayant déjà été mis en place, des résultats devraient être obtenus rapidement.

# *Bibliographie*

# Bibliographie

1. WHO, *World malaria report 2012*. World Health Organization, World Malaria report 2012, 2012: p. 1-288.
2. Mohan, A., S.K. Sharma, and S. Bollineni, *Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria*. J Vector Borne Dis, 2008. **45**(3): p. 179-93.
3. Devine, D.V., *The regulation of complement on cell surfaces*. Transfus Med Rev, 1991. **5**(2): p. 123-31.
4. Stoute, J.A., et al., *Loss of red blood cell-complement regulatory proteins and increased levels of circulating immune complexes are associated with severe malarial anemia*. J Infect Dis, 2003. **187**(3): p. 522-5.
5. Sexton, A.C., et al., *Transcriptional profiling reveals suppressed erythropoiesis, up-regulated glycolysis, and interferon-associated responses in murine malaria*. J Infect Dis, 2004. **189**(7): p. 1245-56.
6. Chasis, J.A. and N. Mohandas, *Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis*. Blood, 2008. **112**(3): p. 470-8.
7. Chakravorty, S.J., et al., *Altered phenotype and gene transcription in endothelial cells, induced by Plasmodium falciparum-infected red blood cells: pathogenic or protective?* Int J Parasitol, 2007. **37**(8-9): p. 975-87.
8. Chotivanich, K., et al., *Platelet-induced autoagglutination of Plasmodium falciparum-infected red blood cells and disease severity in Thailand*. J Infect Dis, 2004. **189**(6): p. 1052-5.
9. Pain, A., et al., *Platelet-mediated clumping of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1805-10.
10. Roberts, D.J., et al., *Autoagglutination of malaria-infected red blood cells and malaria severity*. Lancet, 2000. **355**(9213): p. 1427-8.
11. MacPherson, G.G., et al., *Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration*. Am J Pathol, 1985. **119**(3): p. 385-401.
12. Pongponratn, E., et al., *An ultrastructural study of the brain in fatal Plasmodium falciparum malaria*. Am J Trop Med Hyg, 2003. **69**(4): p. 345-59.
13. Silamut, K., et al., *A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain*. Am J Pathol, 1999. **155**(2): p. 395-410.
14. Brown, H., et al., *Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1999. **25**(4): p. 331-40.
15. Brown, H., et al., *Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **64**(3-4): p. 207-13.
16. Brown, H., et al., *Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria*. J Infect Dis, 1999. **180**(5): p. 1742-6.
17. Combes, V., et al., *Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier*. Int J Parasitol, 2006. **36**(5): p. 541-6.
18. Wassmer, S.C., et al., *Platelets reorient Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadhesion to activated endothelial cells*. J Infect Dis, 2004. **189**(2): p. 180-9.
19. Combes, V., et al., *ABCA1 gene deletion protects against cerebral malaria: potential pathogenic role of microparticles in neuropathology*. Am J Pathol, 2005. **166**(1): p. 295-302.
20. Dondorp, A.M., et al., *Direct in vivo assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria*. J Infect Dis, 2008. **197**(1): p. 79-84.
21. Patnaik, J.K., et al., *Vascular clogging, mononuclear cell margination, and enhanced vascular permeability in the pathogenesis of human cerebral malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1994. **51**(5): p. 642-7.

22. Porta, J., et al., *Immunopathological changes in human cerebral malaria*. Clin Neuropathol, 1993. **12**(3): p. 142-6.
23. Taylor, T.E., et al., *Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts*. Nat Med, 2004. **10**(2): p. 143-5.
24. Idro, R., N.E. Jenkins, and C.R. Newton, *Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria*. Lancet Neurol, 2005. **4**(12): p. 827-40.
25. Chakravorty, S.J., K.R. Hughes, and A.G. Craig, *Host response to cytoadherence in Plasmodium falciparum*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 2): p. 221-8.
26. Clayton, A., et al., *Cellular activation through the ligation of intercellular adhesion molecule-1*. J Cell Sci, 1998. **111** ( Pt 4): p. 443-53.
27. Wassmer, S.C., et al., *Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by Plasmodium falciparum*. Infect Immun, 2006. **74**(1): p. 645-53.
28. Krishnegowda, G., et al., *Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8606-16.
29. Patel, S.N., et al., *Disruption of CD36 impairs cytokine response to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria in vivo*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3954-61.
30. Schofield, L. and F. Hackett, *Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites*. J Exp Med, 1993. **177**(1): p. 145-53.
31. Schofield, L., et al., *Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria*. Nature, 2002. **418**(6899): p. 785-9.
32. Coban, C., et al., *Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 19-25.
33. Artavanis-Tsakonas, K., J.E. Tongren, and E.M. Riley, *The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(2): p. 145-52.
34. Hansen, D.S. and L. Schofield, *Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies?* PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000771.
35. Hunt, N.H. and G.E. Grau, *Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria*. Trends Immunol, 2003. **24**(9): p. 491-9.
36. Riley, E.M., et al., *Regulating immunity to malaria*. Parasite Immunol, 2006. **28**(1-2): p. 35-49.
37. van der Heyde, H.C., et al., *A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction*. Trends Parasitol, 2006. **22**(11): p. 503-8.
38. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
39. Schall, T.J. and K.B. Bacon, *Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(6): p. 865-73.
40. Stevenson, M.M. and E.M. Riley, *Innate immunity to malaria*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 169-80.
41. Schofield, L. and G.E. Grau, *Immunological processes in malaria pathogenesis*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(9): p. 722-35.
42. Brown, A.E., P. Teja-Isavadharm, and H.K. Webster, *Macrophage activation in vivax malaria: fever is associated with increased levels of neopterin and interferon-gamma*. Parasite Immunol, 1991. **13**(6): p. 673-9.
43. Doodoo, D., et al., *Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria*. J Infect Dis, 2002. **185**(7): p. 971-9.

44. Jain, V., et al., *A preliminary study on pro- and anti-inflammatory cytokine profiles in Plasmodium vivax malaria patients from central zone of India*. Acta Trop, 2010. **113**(3): p. 263-268.
45. Jason, J., et al., *Cytokines and malaria parasitemia*. Clin Immunol, 2001. **100**(2): p. 208-18.
46. Newton, C.R. and S. Krishna, *Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment*. Pharmacol Ther, 1998. **79**(1): p. 1-53.
47. Akanmori, B.D., et al., *Distinct patterns of cytokine regulation in discrete clinical forms of Plasmodium falciparum malaria*. Eur Cytokine Netw, 2000. **11**(1): p. 113-8.
48. Grau, G.E., et al., *Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria*. N Engl J Med, 1989. **320**(24): p. 1586-91.
49. Kurtzhals, J.A., et al., *Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria*. Lancet, 1998. **351**(9118): p. 1768-72.
50. Kwiatkowski, D., *Tumour necrosis factor, fever and fatality in falciparum malaria*. Immunol Lett, 1990. **25**(1-3): p. 213-6.
51. Luty, A.J., et al., *Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 3909-15.
52. Perkins, D.J., J.B. Weinberg, and P.G. Kremsner, *Reduced interleukin-12 and transforming growth factor-beta1 in severe childhood malaria: relationship of cytokine balance with disease severity*. J Infect Dis, 2000. **182**(3): p. 988-92.
53. Othoro, C., et al., *A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya*. J Infect Dis, 1999. **179**(1): p. 279-82.
54. Huber, C., et al., *Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma*. J Exp Med, 1984. **160**(1): p. 310-6.
55. Wachter, H., et al., *Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application*. Adv Clin Chem, 1989. **27**: p. 81-141.
56. Biemba, G., et al., *Markers of inflammation in children with severe malarial anaemia*. Trop Med Int Health, 2000. **5**(4): p. 256-62.
57. Biemba, G., et al., *Prolonged macrophage activation and persistent anaemia in children with complicated malaria*. Trop Med Int Health, 1998. **3**(1): p. 60-5.
58. Goka, B.Q., et al., *Complement binding to erythrocytes is associated with macrophage activation and reduced haemoglobin in Plasmodium falciparum malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2001. **95**(5): p. 545-9.
59. Peyron, F., et al., *Plasma levels of tumor necrosis factor (TNF) and neopterin during an attack of malaria*. Ann Soc Belg Med Trop, 1991. **71**(1): p. 63-6.
60. Clark, I.A., et al., *Induction of HO-1 in tissue macrophages and monocytes in fatal falciparum malaria and sepsis*. Malar J, 2003. **2**(1): p. 41.
61. Maitland, K. and K. Marsh, *Pathophysiology of severe malaria in children*. Acta Trop, 2004. **90**(2): p. 131-40.
62. Good, M.F., et al., *Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 69-99.
63. Eryuksel, E., et al., *Acute respiratory distress syndrome in Plasmodium falciparum malaria*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2009. **40**(6): p. 1179-82.
64. Anstey, N.M., et al., *Lung injury in vivax malaria: pathophysiological evidence for pulmonary vascular sequestration and posttreatment alveolar-capillary inflammation*. J Infect Dis, 2007. **195**(4): p. 589-96.
65. Taylor, W.R., V. Canon, and N.J. White, *Pulmonary manifestations of malaria : recognition and management*. Treat Respir Med, 2006. **5**(6): p. 419-28.
66. Hee, L., et al., *Reduced activity of the epithelial sodium channel in malaria-induced pulmonary oedema in mice*. Int J Parasitol, 2011. **41**(1): p. 81-8.

67. Epiphanio, S., et al., *VEGF promotes malaria-associated acute lung injury in mice*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000916.
68. Van den Steen, P.E., et al., *Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(9): p. 957-68.
69. Parroche, P., et al., *Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(6): p. 1919-24.
70. Togbe, D., et al., *Murine Cerebral Malaria Development Is Independent of Toll-Like Receptor Signaling*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1640-8.
71. Corrigan, R.A. and J.A. Rowe, *Strain variation in early innate cytokine induction by Plasmodium falciparum*. Parasite Immunol, 2010. **32**(7): p. 512-27.
72. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway's Immunobiology (Immunobiology: The Immune System (Janeway))*. 7th ed. 2007: Garland Science.
73. Rockett, K.A., et al., *Killing of Plasmodium falciparum in vitro by nitric oxide derivatives*. Infect Immun, 1991. **59**(9): p. 3280-3.
74. Currier, J., J. Sattabongkot, and M.F. Good, *'Natural' T cells responsive to malaria: evidence implicating immunological cross-reactivity in the maintenance of TCR alpha beta+ malaria-specific responses from non-exposed donors*. Int Immunol, 1992. **4**(9): p. 985-94.
75. Dick, S., et al., *Naive human alpha beta T cells respond to membrane-associated components of malaria-infected erythrocytes by proliferation and production of interferon-gamma*. Immunology, 1996. **88**(3): p. 412-20.
76. Hensmann, M. and D. Kwiatkowski, *Cellular basis of early cytokine response to Plasmodium falciparum*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2364-71.
77. Scragg, I.G., et al., *Early cytokine induction by Plasmodium falciparum is not a classical endotoxin-like process*. Eur J Immunol, 1999. **29**(8): p. 2636-44.
78. Waterfall, M., A. Black, and E. Riley, *Gammadelta+ T cells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites*. Infect Immun, 1998. **66**(5): p. 2393-8.
79. Zevering, Y., et al., *High frequency of malaria-specific T cells in non-exposed humans*. Eur J Immunol, 1992. **22**(3): p. 689-96.
80. Artavanis-Tsakonas, K. and E.M. Riley, *Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 2956-63.
81. Mohan, K., P. Moulin, and M.M. Stevenson, *Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection*. J Immunol, 1997. **159**(10): p. 4990-8.
82. Torre, D., et al., *Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(2): p. 348-51.
83. Furuta, T., et al., *Protective roles of mast cells and mast cell-derived TNF in murine malaria*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3294-302.
84. Leoratti, F.M., et al., *Pattern of humoral immune response to Plasmodium falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria*. Malar J, 2008. **7**: p. 186.
85. Amaratunga, C., et al., *A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to Plasmodium falciparum malaria*. PLoS ONE, 2011. **6**(4): p. e14798.
86. Brown, A.E., et al., *Macrophage activation in falciparum malaria as measured by neopterin and interferon-gamma*. Clin Exp Immunol, 1990. **82**(1): p. 97-101.
87. Rhee, M.S., et al., *Changes in cytokine production associated with acquired immunity to Plasmodium falciparum malaria*. Clin Exp Immunol, 2001. **126**(3): p. 503-10.
88. Ringwald, P., et al., *Levels of cytokines in plasma during Plasmodium falciparum malaria attacks*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(9): p. 2076-8.

89. Wroczynska, A., et al., *Cytokines and clinical manifestations of malaria in adults with severe and uncomplicated disease*. Int Marit Health, 2005. **56**(1-4): p. 103-14.
90. Clark, I.A. and W.B. Cowden, *Roles of TNF in malaria and other parasitic infections*. Immunol Ser, 1992. **56**: p. 365-407.
91. Shaffer, N., et al., *Tumor necrosis factor and severe malaria*. J Infect Dis, 1991. **163**(1): p. 96-101.
92. Perera, M.K., et al., *Association of high plasma TNF-alpha levels and TNF-alpha/IL-10 ratios with TNF2 allele in severe P. falciparum malaria patients in Sri Lanka*. Pathog Glob Health, 2013. **107**(1): p. 21-9.
93. Boeuf, P.S., et al., *Insights into deregulated TNF and IL-10 production in malaria: implications for understanding severe malarial anaemia*. Malar J, 2012. **11**: p. 253.
94. Kobayashi, F., et al., *Production of interleukin 10 during malaria caused by lethal and nonlethal variants of Plasmodium yoelii yoelii*. Parasitol Res, 1996. **82**(5): p. 385-91.
95. Lyke, K.E., et al., *Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls*. Infect Immun, 2004. **72**(10): p. 5630-7.
96. Musumeci, M., et al., *Modulation of immune response in Plasmodium falciparum malaria: role of IL-12, IL-18 and TGF-beta*. Cytokine, 2003. **21**(4): p. 172-8.
97. Tangteerawatana, P., et al., *Relative levels of IL4 and IFN-gamma in complicated malaria: association with IL4 polymorphism and peripheral parasitemia*. Acta Trop, 2007. **101**(3): p. 258-65.
98. Hugosson, E., et al., *Higher IL-10 levels are associated with less effective clearance of Plasmodium falciparum parasites*. Parasite Immunol, 2004. **26**(3): p. 111-7.
99. Hugosson, E., et al., *Relationship between antipyretic effects and cytokine levels in uncomplicated falciparum malaria during different treatment regimes*. Acta Trop, 2006. **99**(1): p. 75-82.
100. Baptista, J.L., et al., *Cytokine levels during mild and cerebral falciparum malaria in children living in a mesoendemic area*. Trop Med Int Health, 1997. **2**(7): p. 673-9.
101. Ayimba, E., et al., *Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria*. Clin Exp Immunol, 2011. **166**(2): p. 218-226.
102. Ochiel, D.O., et al., *Differential regulation of beta-chemokines in children with Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4190-7.
103. Doolan, D.L., C. Dobano, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(1): p. 13-36, Table of Contents.
104. Langhorne, J., et al., *Immunity to malaria: more questions than answers*. Nat Immunol, 2008. **9**(7): p. 725-32.
105. Handojo, T., et al., *Normal spirometry, gas transfer and lung volume values in Papua, Indonesia*. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2006. **37**(3): p. 571-7.
106. Maguire, G.P., et al., *Lung injury in uncomplicated and severe falciparum malaria: a longitudinal study in Papua, Indonesia*. J Infect Dis, 2005. **192**(11): p. 1966-74.
107. Divis, P.C., et al., *A TaqMan real-time PCR assay for the detection and quantitation of Plasmodium knowlesi*. Malar J, 2010. **9**: p. 344.
108. Rougemont, M., et al., *Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(12): p. 5636-43.
109. Dondorp, A.M., E. Pongponratn, and N.J. White, *Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology*. Acta Trop, 2004. **89**(3): p. 309-17.
110. Desakorn, V., et al., *Stage-dependent production and release of histidine-rich protein 2 by Plasmodium falciparum*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2005. **99**(7): p. 517-24.

111. Dondorp, A.M., et al., *Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2*. PLoS Med, 2005. **2**(8): p. e204.
112. Hendriksen, I.C., et al., *Diagnosing severe falciparum malaria in parasitaemic African children: a prospective evaluation of plasma PfHRP2 measurement*. PLoS Med, 2012. **9**(8): p. e1001297.
113. Wilson, N.O., et al., *Elevated levels of IL-10 and G-CSF associated with asymptomatic malaria in pregnant women*. Infect Dis Obstet Gynecol, 2010. **2010**.
114. Sinha, S., et al., *Distinct cytokine profiles define clinical immune response to falciparum malaria in regions of high or low disease transmission*. Eur Cytokine Netw, 2010. **21**(4): p. 232-40.
115. Cox-Singh, J., et al., *Anti-inflammatory cytokines predominate in acute human Plasmodium knowlesi infections*. PLoS ONE, 2011. **6**(6): p. e20541.
116. Winkler, S., et al., *Reciprocal regulation of Th1- and Th2-cytokine-producing T cells during clearance of parasitemia in Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 6040-4.
117. Kumaratilake, L.M., et al., *Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to Plasmodium falciparum merozoites*. Infect Immun, 1992. **60**(9): p. 3731-8.
118. Wang, X.M., et al., *Upregulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: Correlation to clinical pain*. Pain, 2009. **142**(3): p. 275-83.
119. Abrams, E.T., et al., *Host response to malaria during pregnancy: placental monocyte recruitment is associated with elevated beta chemokine expression*. J Immunol, 2003. **170**(5): p. 2759-64.
120. Bostrom, S., et al., *Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to Plasmodium falciparum infection in children living in sympatry in Mali*. Malar J, 2012. **11**(1): p. 109.
121. Sherry, B.A., et al., *Malaria-specific metabolite hemozoin mediates the release of several potent endogenous pyrogens (TNF, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta) in vitro, and altered thermoregulation in vivo*. J Inflamm, 1995. **45**(2): p. 85-96.
122. Deroost, K., et al., *Hemozoin Induces Lung Inflammation and Correlates with Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013.
123. Roberts, A.W., *G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!* Growth Factors, 2005. **23**(1): p. 33-41.
124. Linden, A., *Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma*. Int Arch Allergy Immunol, 2001. **126**(3): p. 179-84.
125. Ueno, T., et al., *Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3282-9.
126. Conroy, A., et al., *C5a enhances dysregulated inflammatory and angiogenic responses to malaria in vitro: potential implications for placental malaria*. PLoS ONE, 2009. **4**(3): p. e4953.
127. Conroy, A., *Biomarkers of Severe Malaria: Complement Activation and Dysregulated Angiogenesis in Placental Malaria and Cerebral Malaria*, in *Laboratory Medicine and Pathobiology 2011*, University of Toronto: Toronto.
128. Moncunill, G., et al., *Cytokine and Antibody Responses to Plasmodium falciparum in Naive Individuals during a First Malaria Episode: Effect of Age and Malaria Exposure*. PLoS ONE, 2013. **8**(2): p. e55756.
129. Ouyang, W., et al., *Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 71-109.
130. Davis, B.K., H. Wen, and J.P. Ting, *The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 707-35.
131. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 459-89.

132. Spits, H. and T. Cupedo, *Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 647-75.
133. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
134. Villegas-Mendez, A., et al., *Heterogeneous and Tissue-Specific Regulation of Effector T Cell Responses by IFN- $\gamma$  during Plasmodium berghei ANKA Infection*. J Immunol, 2011. **187**(6): p. 2885-97.
135. Warimwe, G.M., et al., *The ratio of monocytes to lymphocytes in peripheral blood correlates with increased susceptibility to clinical malaria in kenyan children*. PLoS ONE, 2013. **8**(2): p. e57320.
136. Sun, T., et al., *A Plasmodium-encoded cytokine suppresses T-cell immunity during malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. E2117-26.
137. Nascimento, E.J., et al., *Gene expression profiling during early acute febrile stage of dengue infection can predict the disease outcome*. PLoS ONE, 2009. **4**(11): p. e7892.
138. Delahaye, N.F., et al., *Gene expression analysis reveals early changes in several molecular pathways in cerebral malaria-susceptible mice versus cerebral malaria-resistant mice*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 452.
139. Lovegrove, F.E., et al., *Simultaneous host and parasite expression profiling identifies tissue-specific transcriptional programs associated with susceptibility or resistance to experimental cerebral malaria*. BMC Genomics, 2006. **7**: p. 295.
140. Oakley, M.S., et al., *Molecular correlates of experimental cerebral malaria detectable in whole blood*. Infect Immun, 2011. **79**(3): p. 1244-53.
141. Barbier, M., et al., *Platelets alter gene expression profile in human brain endothelial cells in an in vitro model of cerebral malaria*. PLoS ONE, 2011. **6**(5): p. e19651.
142. Krupka, M., et al., *Mild Plasmodium falciparum malaria following an episode of severe malaria is associated with induction of the interferon pathway in Malawian children*. Infect Immun, 2012. **80**(3): p. 1150-5.
143. Hu, W.-C.W.-J., et al., *Human Immune Responses to Plasmodium falciparum infection: Molecular Evidence for a Suboptimal TH $\alpha$ 6(TH9) and TH17 Bias over Ideal and Effective Traditional TH1 Immunity*. Available from Nature Precedings, 2011.
144. Hu, W.-C.W.-J., et al. (2011) *Microarray Analysis of PBMC after Plasmodium falciparum Infection: Molecular Insights into Disease Pathogenesis*. Available from Nature Precedings.
145. Ockenhouse, C.F., et al., *Common and divergent immune response signaling pathways discovered in peripheral blood mononuclear cell gene expression patterns in presymptomatic and clinically apparent malaria*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5561-73.
146. Torcia, M.G., et al., *Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to Plasmodium falciparum malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 646-51.
147. Griffiths, M.J., et al., *Genomewide analysis of the host response to malaria in Kenyan children*. J Infect Dis, 2005. **191**(10): p. 1599-611.
148. Idaghdour, Y., et al., *Evidence for additive and interaction effects of host genotype and infection in malaria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(42): p. 16786-93.
149. Franklin, B.S., et al., *Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(14): p. 5789-94.
150. Stroncek, D.F., *Neutrophil-specific antigen HNA-2a, NB1 glycoprotein, and CD177*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(6): p. 688-93.
151. Ladhani, S., et al., *Changes in white blood cells and platelets in children with falciparum malaria: relationship to disease outcome*. Br J Haematol, 2002. **119**(3): p. 839-47.
152. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.

153. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
154. Kawabata, K., T. Hagio, and S. Matsuoka, *The role of neutrophil elastase in acute lung injury*. Eur J Pharmacol, 2002. **451**(1): p. 1-10.
155. Pittet, J.F., et al., *TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1537-44.
156. Schrier, R.W., et al., *Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy*. J Clin Invest, 2004. **114**(1): p. 5-14.
157. Senaldi, G., et al., *Role of polymorphonuclear neutrophil leukocytes and their integrin CD11a (LFA-1) in the pathogenesis of severe murine malaria*. Infect Immun, 1994. **62**(4): p. 1144-9.
158. Hogger, P. and C. Sorg, *Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(4): p. 841-3.
159. Lee, T.S. and L.Y. Chau, *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 240-6.
160. Philippidis, P., et al., *Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery*. Circ Res, 2004. **94**(1): p. 119-26.
161. Kusi, K.A., et al., *Levels of soluble CD163 and severity of malaria in children in Ghana*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(9): p. 1456-60.
162. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
163. Shio, M.T., et al., *Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases*. PLoS Pathog, 2009. **5**(8): p. e1000559.
164. Zhou, J., et al., *Osonization of malaria-infected erythrocytes activates the inflammasome and enhances inflammatory cytokine secretion by human macrophages*. Malar J, 2012. **11**: p. 343.
165. Poss, K.D. and S. Tonegawa, *Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10925-30.
166. Li, R.C., et al., *Heme-hemopexin complex attenuates neuronal cell death and stroke damage*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(5): p. 953-64.
167. Tolosano, E. and F. Altruda, *Hemopexin: structure, function, and regulation*. DNA Cell Biol, 2002. **21**(4): p. 297-306.
168. Nagy, E., et al., *Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(7): p. 1347-53.
169. Cunnington, A.J., et al., *Prolonged neutrophil dysfunction after Plasmodium falciparum malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction*. J Immunol, 2012. **189**(11): p. 5336-46.
170. Cunnington, A.J., et al., *Malaria impairs resistance to Salmonella through heme- and heme oxygenase-dependent dysfunctional granulocyte mobilization*. Nat Med, 2012. **18**(1): p. 120-7.
171. WHO, *Severe falciparum malaria*. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2000. **94 Suppl 1**: p. S1-90.
172. Amodu, O.K., et al., *Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1998. **92**(1): p. 54-6.
173. Waki, S., *Antibody-dependent neutrophil-mediated parasite killing in non-lethal rodent malaria*. Parasite Immunol, 1994. **16**(11): p. 587-91.
174. Daily, J.P., et al., *Distinct physiological states of Plasmodium falciparum in malaria-infected patients*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 1091-5.

# *Annexes*

**Annexe 1a. Corrélation entre les données cliniques et les médiateurs inflammatoires solubles à l'admission chez les patients impaludés.**

**Corrélations entre les médiateurs inflammatoires solubles et les mesures cliniques biologiques (Log/Log Spearman)\***

	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-7	IL-8	MCP-1	MIP-1 $\beta$	P/TCTP	Leucocytes	Hémoglobine	Lymphocytes	Macrophages	SpO2
Leucocytes	0,893	0,371	-0,012	0,719	0,922	0,671	0,378	0,602	0,802	0,036	0,036	0,252	NA	1,000	-0,515	-0,419	0,736	0,387
Hémoglobine	0,172	0,093	0,078	-0,086	-0,124	-0,006	0,029	-0,016	0,029	-0,035	0,122	0,093	0,038	-0,515	1,000	-0,262	-0,317	0,033
Hématocrite	0,071	0,089	0,061	-0,070	-0,108	-0,047	0,063	-0,044	0,029	0,088	0,043	0,071	0,110	-0,611	0,890	-0,095	-0,390	-0,015
Lymphocytes	-0,643	-0,314	-0,619	-0,262	-0,333	-0,143	-0,342	0,036	-0,286	0,167	-0,452	-0,238	NA	-0,419	-0,262	1,000	-0,098	-0,143
Macrophages	0,667	0,812	-0,073	0,561	0,683	0,586	0,218	0,515	0,390	0,122	-0,220	0,366	NA	0,736	-0,317	-0,098	1,000	0,134
Neutrophiles	0,092	0,143	0,833	0,262	0,048	0,143	-0,048	-0,048	0,119	0,000	0,762	0,333	NA	0,108	0,405	-0,881	-0,220	0,326
SpO2	0,086	0,338	0,053	0,213	0,121	0,327	0,341	0,104	0,069	0,406	0,274	0,373	0,490	0,387	0,033	-0,143	0,134	1,000
Bilirubine D	0,429	0,900	0,429	0,893	0,214	0,893	0,771	0,775	0,214	0,607	0,607	0,607	NA	0,252	-0,143	0,214	0,445	0,810
Bilirubine T	-0,486	0,300	0,429	0,071	-0,321	0,071	-0,314	-0,162	-0,500	0,857	0,429	0,786	NA	0,685	-0,107	-0,071	0,778	0,694
Créatinémie	0,297	0,223	0,318	0,238	0,196	0,146	0,304	0,026	0,243	0,392	0,237	0,211	0,350	-0,228	-0,022	0,286	0,259	0,540
Glycémie																	0,098	0,120

**P-value**

	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-7	IL-8	MCP-1	MIP-1 $\beta$	P/TCTP	Leucocytes	Hémoglobine	Lymphocytes	Macrophages	SpO2
Leucocytes	6,81E-03	ns	ns	4,46E-02	1,11E-03	ns	ns	ns	1,65E-02	ns	ns	ns	NA	NA	ns	ns	3,72E-02	ns
Hémoglobine	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns
Hématocrite	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,00	ns	ns	ns
Lymphocytes	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	NA	ns	ns
Macrophages	ns	4,99E-02	ns	NA	3,72E-02	ns	ns	NA	ns									
Neutrophiles	ns	ns	1,02E-02	ns	2,80E-02	ns	NA	ns	ns	3,85E-03	ns	ns						
SpO2	ns	4,70E-02	ns	ns	ns	3,44E-02	3,35E-02	ns	ns	7,72E-03	ns	1,50E-02	1,51E-02	ns	ns	ns	ns	NA
Bilirubine D	ns	3,74E-02	ns	6,81E-03	ns	6,81E-03	ns	4,08E-02	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	3,93E-02	2,72E-02
Bilirubine T	ns	3,74E-02	ns	1,37E-02	ns	3,62E-02	NA	ns	ns	ns	ns	ns						
Créatinémie	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns
Glycémie	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,00E-02	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

NA : valeur non attribuée

ns : non significatif

\* : les constantes pour lesquelles aucune corrélation n'a été établie ne sont pas représentées dans ce tableau (IL-6, IL-17, P/IgE, TNF- $\alpha$ , température, basophiles, éosinophiles, macrophages)

**Annexe 1b. Corrélation entre les données cliniques et les médiateurs inflammatoires solubles à l'admission chez les patients impaludés.**

**Corrélations entre les médiateurs inflammatoires solubles et les mesures cliniques biologiques (Log/Log Spearman)\***

	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-12	IL-13	IL-5	IL-6	IL-8	P/IgE	MIP-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	Hémoglobine	Hématocrite	Lymphocytes	Monocytes	Neutrophiles	Créatinémie
Eosinophiles	-0,784	ns	-0,784	-0,866	ns	ns	-0,825	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Leucocytes	ns	ns	ns	0,762	ns	0,714	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Hémoglobine	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	0,983	ns	ns	ns	0,743
Hématocrite	ns	-0,667	ns	ns	-0,683	ns	ns	ns	ns	ns	0,983	NA	ns	ns	ns	0,743
Lymphocytes	ns	0,711	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	-0,988	ns
Monocytes	ns	ns	0,764	ns	0,709	ns	ns	0,757	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Neutrophiles	ns	-0,738	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,738	ns	ns	-0,988	ns	NA	ns
Bilirubine D	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bilirubine T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,738	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Créatinémie	ns	-0,826	-0,766	ns	-0,958	ns	ns	ns	0,778	ns	0,743	0,743	ns	-0,672	ns	NA

**P-value**

	G.CSF	IFN.g	IL.12	IL.13	IL.5	IL.6	IL.8	IgE_Pf	MIP.1b	TNFa	Hémoglobine	Hématocrite	Lymphocytes	Monocytes	Neutrophiles	Créatinémie
Eosinophiles	0,021	ns	0,021	0,005	ns	ns	0,012	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Leucocytes	ns	ns	ns	0,028	ns	0,047	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Hémoglobine	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	1,94E-06	ns	ns	ns	0,035
Hématocrite	ns	0,050	ns	ns	0,042	ns	ns	ns	ns	ns	1,94E-06	NA	ns	ns	ns	0,035
Lymphocytes	ns	0,048	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	4,26E-06	ns
Monocytes	ns	ns	0,027	ns	0,049	ns	ns	0,049	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Neutrophiles	ns	0,037	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,037	ns	ns	4,26E-06	ns	NA	ns
Bilirubine D	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bilirubine T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,037	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Créatinémie	ns	0,011	0,027	ns	1,78E-04	ns	ns	ns	0,023	ns	3,49E-02	3,49E-02	ns	0,068	ns	NA

NA : valeur non attribuée

ns : non significatif

\* : les constantes non mentionnées dans ce tableau ne présenteraient aucune corrélation avec une autre constante

Annexe 2a. Tests de corrélation sur le log des médianes des patients présentant un accès palustre grave, avec ou sans atteinte pulmonaire associée entre les médiateurs inflammatoires à l'admission avec la confiance de celle-ci (p-value).

Coefficients de corrélation (r <sub>s</sub> )																				
	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	P/IgE	IgE	MCP-1	MIP-1 $\beta$	P/TCTP	TNF- $\alpha$	P/HRP2	
G-CSF	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,753	ns	ns	ns	ns	ns
IFN- $\gamma$	ns	NA	ns	0,839	ns	0,733	0,615	0,825	0,609	0,732	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,867	ns	ns
IL-10	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,764	ns	ns	ns	ns	ns	0,731	ns	ns	ns	ns
IL-12	ns	0,839	ns	NA	0,775	0,917	0,753	0,769	0,664	0,654	0,710	ns	ns	ns	ns	ns	0,736	0,868	ns	ns
IL-13	ns	ns	ns	0,775	NA	ns	0,681	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,571	ns	ns	0,873	ns	0,682	ns
IL-17	ns	0,733	ns	0,917	ns	NA	0,733	0,883	0,783	0,850	ns	ns	-0,857	ns	ns	0,667	ns	0,733	ns	ns
IL-1b	ns	0,615	ns	0,753	0,681	0,733	NA	0,769	0,700	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,599	ns	ns
IL-4	ns	0,825	ns	0,769	ns	0,883	0,769	NA	0,655	0,760	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,755	ns	ns
IL-5	ns	0,609	ns	0,664	ns	0,783	0,700	NA	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-6	ns	0,609	ns	0,664	ns	0,850	0,700	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	0,665	0,681	ns	0,659	ns	ns
IL-7	ns	0,732	ns	0,710	ns	ns	ns	0,760	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,594	ns	ns
IL-8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P/IgE	ns	ns	ns	ns	ns	-0,857	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IgE	ns	ns	ns	ns	0,571	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MCP-1	0,753	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,665	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	0,599	ns	ns
MIP-1 $\beta$	ns	ns	0,731	ns	ns	0,667	ns	ns	ns	0,681	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	0,594
P/TCTP	ns	ns	ns	0,736	0,873	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	0,736	ns	ns
TNF- $\alpha$	ns	0,867	ns	0,868	0,533	0,733	0,599	0,755	ns	0,659	0,594	ns	ns	ns	0,599	ns	0,736	NA	ns	ns
P/HRP2	ns	ns	ns	ns	0,682	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,594	ns	ns	ns	NA

P-value																				
	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	P/IgE	IgE	MCP-1	MIP-1 $\beta$	P/TCTP	TNF- $\alpha$	P/HRP2	
G-CSF	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,003	ns	ns	ns	ns	ns
IFN- $\gamma$	ns	NA	ns	6,43E-04	ns	0,025	0,033	9,51E-04	0,047	ns	0,007	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2,60E-04	ns	ns
IL-10	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,002	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	ns	ns	ns
IL-12	ns	6,43E-04	ns	NA	0,002	5,07E-04	0,003	0,003	0,026	0,015	0,007	ns	ns	ns	ns	ns	0,037	1,19E-04	ns	ns
IL-13	ns	ns	ns	0,002	NA	ns	0,010	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,041	ns	ns	0,005	ns	ns	0,010
IL-17	ns	0,025	ns	0,001	ns	NA	0,025	0,002	0,013	0,004	ns	ns	0,014	ns	ns	0,050	ns	0,025	ns	ns
IL-1b	ns	0,033	ns	0,003	0,010	0,025	NA	0,003	0,016	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,031	ns	ns
IL-4	ns	9,51E-04	ns	0,003	ns	0,002	0,003	NA	0,029	ns	0,004	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,005	ns	ns
IL-5	ns	0,047	ns	0,026	ns	0,013	0,016	0,029	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-6	ns	ns	0,002	0,015	ns	0,004	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	0,013	0,010	ns	0,014	ns	ns
IL-7	ns	0,007	ns	0,007	ns	ns	ns	0,004	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,032	ns	ns
IL-8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P/IgE	ns	ns	ns	ns	ns	0,014	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IgE	ns	ns	ns	ns	0,041	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MCP-1	0,003	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,013	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	0,031	ns	ns
MIP-1 $\beta$	ns	ns	0,005	ns	ns	0,050	ns	ns	ns	0,010	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	0,032
P/TCTP	ns	ns	ns	0,037	0,005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA	0,037	ns	ns
TNF- $\alpha$	ns	2,60E-04	ns	1,19E-04	ns	0,025	0,031	0,005	ns	0,014	0,032	ns	ns	ns	0,031	ns	0,037	NA	ns	ns
P/HRP2	ns	ns	ns	ns	0,010	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,032	ns	ns	ns	NA

NA : non applicable  
ns : non significatif

Annexe 2b. Tests de corrélation sur le log des médianes des patients présentant un accès palustre simple entre les médiateurs inflammatoires à l'admission avec la confiance de celle-ci (*p*-value).

Coefficients de corrélation ( <i>r</i> <sub>s</sub> )																			
	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	<i>P</i> /IgE	IgE	MCP-1	MIP- $\beta$	<i>P</i> /TCTP	TNF- $\alpha$	<i>P</i> /HRP2
G-CSF	NA	0,550	ns	0,521	0,708	ns	0,492	0,664	0,527	ns	0,728	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,652	ns
IFN- $\gamma$	0,550	NA	ns	0,753	0,490	0,511	0,896	0,884	0,733	ns	0,537	ns	ns	ns	0,379	ns	0,713	0,883	ns
IL-10	ns	ns	NA	0,356	ns	ns	ns	ns	ns	0,800	ns	ns	ns	0,515	ns	ns	ns	ns	0,330
IL-12	0,521	0,753	0,356	NA	0,751	0,628	0,824	0,780	0,810	0,529	0,724	0,302	0,418	-0,025	0,402	0,257	0,559	0,741	ns
IL-13	0,708	0,490	ns	0,751	NA	ns	0,582	0,652	0,656	ns	0,900	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,570	ns
IL-17	ns	0,511	ns	0,628	ns	NA	0,611	0,567	0,476	ns	ns	ns	0,681	ns	ns	ns	0,685	0,477	ns
IL-1b	0,492	0,896	ns	0,824	0,582	0,611	NA	0,828	0,766	0,432	0,571	0,383	0,416	ns	0,387	ns	0,634	0,767	ns
IL-4	0,664	0,884	ns	0,780	0,652	0,567	0,828	NA	0,685	0,387	0,662	ns	ns	ns	0,347	ns	0,625	0,811	ns
IL-5	0,527	0,733	ns	0,810	0,656	0,476	0,766	0,685	NA	ns	0,750	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,719	ns
IL-6	ns	0,800	ns	0,529	ns	ns	0,432	0,387	ns	NA	ns	ns	ns	ns	0,658	0,377	0,485	0,409	ns
IL-7	0,728	0,537	ns	0,724	0,900	ns	0,571	0,662	0,750	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	0,574	0,615	ns
IL-8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,383	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	0,363	0,645	ns	ns	ns
<i>P</i> /IgE	ns	ns	ns	0,418	0,218	0,681	0,416	0,337	0,331	0,051	0,214	-0,115	NA	0,218	0,031	-0,103	0,660	0,295	ns
IgE	ns	ns	ns	ns	0,121	-0,229	-0,051	-0,155	-0,011	0,030	0,087	-0,237	0,218	NA	-0,034	-0,181	-0,016	-0,101	ns
MCP-1	ns	0,379	0,515	0,402	0,126	0,100	0,387	0,347	0,312	0,658	0,274	0,363	0,031	-0,034	NA	0,578	0,409	0,415	ns
MIP- $\beta$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,377	ns	0,645	ns	ns	0,578	NA	ns	ns	ns
<i>P</i> /TCTP	ns	0,713	ns	0,559	ns	0,685	0,634	0,625	ns	0,485	ns	ns	0,660	ns	0,409	ns	NA	0,574	ns
TNF- $\alpha$	0,652	0,883	ns	0,741	0,570	0,477	0,767	0,811	0,719	0,409	0,615	ns	ns	ns	0,415	0,111	0,574	NA	ns
<i>P</i> /HRP2	ns	ns	-0,038	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA

P-value																			
	G-CSF	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-12	IL-13	IL-17	IL-1b	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	<i>P</i> /IgE	IgE	MCP-1	MIP- $\beta$	<i>P</i> /TCTP	TNF- $\alpha$	<i>P</i> /HRP2
G-CSF	NA	7,50E-04	ns	6,80E-04	3,30E-07	ns	0,001	4,13E-06	0,001	ns	1,03E-07	ns	ns	ns	ns	ns	6,76E-06	ns	ns
IFN- $\gamma$	7,50E-04	NA	ns	2,83E-07	0,003	0,036	8,36E-13	4,35E-12	8,42E-07	ns	0,001	ns	ns	ns	0,027	ns	6,09E-04	5,12E-12	ns
IL-10	ns	ns	NA	0,026	ns	ns	ns	ns	ns	2,87E-09	ns	ns	ns	0,001	ns	ns	ns	ns	0,040
IL-12	6,80E-04	2,83E-07	0,026	NA	2,36E-08	0,005	6,57E-11	4,95E-09	4,04E-10	0,001	1,31E-07	ns	0,015	ns	0,010	ns	0,006	6,89E-08	ns
IL-13	3,30E-07	0,003	ns	2,36E-08	NA	ns	6,53E-05	6,98E-06	5,89E-06	ns	1,33E-15	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,51E-04	ns
IL-17	ns	0,036	ns	0,005	ns	NA	0,007	0,014	0,046	ns	ns	ns	0,005	ns	ns	ns	0,029	0,045	ns
IL-1b	0,001	8,36E-13	ns	6,57E-11	6,53E-05	0,007	NA	7,76E-11	1,37E-08	0,007	9,60E-05	0,013	0,014	ns	0,012	ns	8,84E-04	1,21E-08	ns
IL-4	4,13E-06	4,35E-12	ns	4,95E-09	6,98E-06	0,014	7,76E-11	NA	2,10E-06	0,020	4,44E-06	ns	ns	ns	0,030	ns	0,001	4,03E-10	ns
IL-5	6,75E-04	8,42E-07	ns	4,04E-10	5,89E-06	0,046	1,37E-08	2,10E-06	NA	ns	3,81E-08	ns	ns	ns	ns	ns	ns	3,67E-07	ns
IL-6	ns	ns	2,87E-09	0,001	ns	ns	0,007	0,020	ns	NA	ns	ns	ns	ns	7,28E-06	0,02	0,026	0,013	ns
IL-7	1,03E-07	0,001	ns	1,31E-07	1,33E-15	ns	9,60E-05	4,44E-06	3,81E-08	ns	NA	ns	ns	ns	0,02	5,33E-06	ns	3,04E-05	ns
IL-8	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,013	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<i>P</i> /IgE	ns	ns	ns	0,015	ns	0,005	0,014	ns	ns	ns	ns	ns	NA	ns	ns	ns	0,002	ns	ns
IgE	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,014	ns	ns	ns	ns	ns	0,224	NA	ns	ns	ns	ns	ns
MCP-1	ns	0,027	0,001	0,010	ns	ns	0,012	0,030	ns	7,28E-06	ns	0,020	ns	NA	7,51E-05	0,047	0,009	0,009	ns
MIP- $\beta$	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,020	ns	5,33E-06	ns	ns	NA	ns	ns	ns	ns
<i>P</i> /TCTP	ns	6,09E-04	ns	0,006	ns	0,029	8,84E-04	0,001	ns	0,026	ns	ns	0,002	0,047	0,675	NA	0,004	0,004	ns
TNF- $\alpha$	6,76E-06	5,12E-12	ns	6,89E-08	1,51E-04	0,045	1,21E-08	4,03E-10	3,67E-07	0,013	0,000	ns	ns	0,009	0,501	0,004	NA	NA	ns
<i>P</i> /HRP2	ns	ns	0,040	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	NA

NA : non applicable

ns : non significatif

*Publications*  
*annexes*

## Publications annexes

- 1 “*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in the Republic of Djibouti: evaluation of their prevalence and potential determinants.” (Khairah B.A. et al., *Malaria J.* 2012, 11:315)
- 2 “Proteomic analysis revealed alterations of the *Plasmodium falciparum* metabolism following salicylhydroxamic acid exposure.” (Torrentino-Madamet et al., *Research and Reports in Tropical Medicine* 2011:2 109–119)
- 3 “Microaerophilic respiratory metabolism of *Plasmodium falciparum* mitochondrion as a drug target.” (Torrentino-Madamet et al., *Curr Mol Med* 2010(1): 29-46)
- 4 “Improvement of the efficacy of dihydroartemisinin with atorvastatin in an experimental cerebral malaria murine model” (Dormoi et al., *Malaria J.*) *En cours*
- 5 “PftetQ and pfmdt copy numbers as predictive molecular markers of decreased ex vivo doxycycline susceptibility in imported *Plasmodium falciparum* malaria.” (Gaillard et al., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*) *En cours*

RESEARCH

Open Access

# *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* infections in the Republic of Djibouti: evaluation of their prevalence and potential determinants

Bouh Abdi Khairah<sup>1,2,3,4,5†</sup>, Sébastien Briolant<sup>1,2†</sup>, Aurélie Pascual<sup>1,2</sup>, Madjid Mokrane<sup>1,2</sup>, Vanessa Machault<sup>6,7</sup>, Christelle Travaillé<sup>1</sup>, Mohamed Abdi Khairah<sup>1,2</sup>, Ismail Hassan Farah<sup>3</sup>, Habib Moussa Ali<sup>3</sup>, Abdul-Ilah Ahmed Abdi<sup>3</sup>, Souleiman Nour Ayeh<sup>4</sup>, Houssein Youssouf Darar<sup>4,8</sup>, Lénaïck Ollivier<sup>9</sup>, Mohamed Killeh Waiss<sup>10</sup>, Hervé Bogreau<sup>1,2</sup>, Christophe Rogier<sup>1,2,11</sup> and Bruno Pradines<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** Formerly known as a hypoendemic malaria country, the Republic of Djibouti declared the goal of pre-eliminating malaria in 2006. The aim of the present study was to evaluate the prevalence of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* and mixed infections in the Djiboutian population by using serological tools and to identify potential determinants of the disease and hotspots of malaria transmission within the country.

**Methods:** The prevalence of *P. falciparum* and *P. vivax* within the districts of the capital city and the rest of the Republic of Djibouti were assessed using 13 and 2 serological markers, respectively. The relationship between the immune humeral response to *P. falciparum* and *P. vivax* and variables such as age, gender, wealth status, urbanism, educational level, distance to rivers/lakes, living area, having fever in the last month, and staying in a malaria-endemic country more than one year was estimated and analysed by questionnaires administered to 1910 Djiboutians. Multivariate ordinal logistic regression models of the immune humeral response were obtained for *P. falciparum* and *P. vivax*.

**Results:** The *P. falciparum* and *P. vivax* seroprevalence rates were 31.5%, CI95% [29.4-33.7] and 17.5%, CI95% [15.8-19.3], respectively. Protective effects against *P. falciparum* and *P. vivax* were female gender, educational level, and never having visited a malaria-endemic area for more than one year. For *P. falciparum* only, a protective effect was observed for not having a fever in the last month, living more than 1.5 km away from lakes and rivers, and younger ages.

**Conclusions:** This is the first study that assessed the seroprevalence of *P. vivax* in the Republic of Djibouti. It is necessary to improve knowledge of this pathogen in order to create an effective elimination programme. As supported by recent observations on the subject, the Republic of Djibouti has probably demonstrated a real decrease in the transmission of *P. falciparum* in the past seven years, which should encourage authorities to improve efforts toward elimination.

**Keywords:** Malaria, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, Seroprevalence, Serological marker, Djibouti

\* Correspondence: bruno.pradines@free.fr

†Equal contributors

<sup>1</sup>Unité de Parasitologie, Département d'Infectiologie de Terrain, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France

<sup>2</sup>Aix Marseille Université, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, Marseille, France

Full list of author information is available at the end of the article

# Microaerophilic Respiratory Metabolism of *Plasmodium falciparum* Mitochondrion as a Drug Target

M. Torrentino-Madamet<sup>\*1</sup>, J. Desplans<sup>1</sup>, C. Travaillé<sup>1</sup>, Y. Jammes<sup>2</sup> and D. Parzy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR-MD3 (Université de la Méditerranée), IRBA, Antenne Marseille (IMTSSA, Le Pharo), Allée du Médecin Colonel Eugène Jamot, BP 60109, 13262 Marseille Cedex 07, France

<sup>2</sup>UMR-MD2, Physiologie et Physiopathologie en Conditions d'Oxygénations Extrêmes, Institut Fédératif de Recherche Jean Roche, Faculté de Médecine Nord, Université de la Méditerranée, Bd. Pierre Dramard, 13916 Marseille Cedex 20, France

**Abstract:** The *Plasmodium falciparum* mitochondrion is an organelle that presents structural and physiological characteristics different from mitochondria in other eukaryotes. Moreover, there are substantial differences in the properties of asexual and sexual mitochondria. One of the reasons is the adaptation of the parasite to different environments, in particular the great differences in oxygen tension between the host and the mosquito.

In this review, we present a synthesis of the recent data on the ultrastructure, the genome and the physiology of the mitochondrion. We try to clarify the mitochondrial role in the intraerythrocytic environment and particularly focus on mitochondrial metabolic pathways that relate to oxidative phosphorylation, including the tricarboxylic acid cycle, *de novo* pyrimidine biosynthesis *via* dihydroorotate dehydrogenase and the particularities of the electron transport chain. In addition, we provide details on certain characteristics like the lack of pyruvate dehydrogenase, the existence of a rotenone-insensitive NADH-dehydrogenase, the possible existence of an alternative oxidase, and uncoupled proteins.

Such unique particularities of parasite mitochondria could be promising targets for development of a new therapy. The elucidation of the role of this organelle in microaerophilic respiratory metabolism and the association of antimalarial drugs with hyperbaric oxygen therapy might provide new treatments for infection by *P. falciparum*.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*, mitochondrion, microaerophilic, respiratory metabolism, TCA, mitochondrial electron transport chain, oxidative stress.

## INTRODUCTION

*Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) is a protozoan parasite responsible for the most severe form of human malaria. This infection causes 2.7 million deaths annually, most of them in African children under the age of five years [1]. The expansion drug resistance remains a serious problem, and the development of new antimalarial drugs is urgent [2].

Because the energy metabolism of *P. falciparum* is quite different from that of the mammalian host, the enzymes of the energy transducing pathways in the parasite are promising targets for antimalarial drugs. In particular, significant advances have been made in our understanding of the importance of *P. falciparum* mitochondria [3, 4]. In parasite cells, mitochondria adapt morphologically and physiologically to the environmental conditions of hosts, particularly O<sub>2</sub> pressure.

In this review, we try to clarify the role of the parasite mitochondrion in the intraerythrocytic

environment with regard to the specific and principally microaerophilic respiratory metabolism of the parasite, and to provide potential targets for the development of novel malaria chemotherapies.

## ULTRASTRUCTURE AND MORPHOLOGY IN ASEQUAL AND SEXUAL STAGES OF *P. FALCIPARUM*

*P. falciparum* parasites are unicellular eukaryotes that possess a dynamic organelle called the mitochondrion that undergoes a series of ultrastructural changes during the life cycle. As others organelles (apicoplast, food vacuole), the mitochondrion is located in cytoplasm. There are apparent variations in the number, morphology and size of mitochondria between the asexual and sexual gametocytic stages [5].

Separate studies using epifluorescence microscopy and transmission electron microscopy (MET) of *P. falciparum* have shown a single mitochondrion with a double-membrane in human intraerythrocytic parasites [6]. It grows from a single, small organelle into a highly branched structure in later-stage parasites. The trophozoite mitochondrion was described as circular in shape with a double membrane, whereas it elongates and becomes proportionately wider in the mature

\*Address correspondence to the author at the Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées, Allée du Médecin Colonel Eugène Jamot, BP 60109, 13262 Marseille Cedex 07, France; Tel: +33-491-150-114; Fax: +33-491-150-164; E-mail: madametm@imtssa.fr

# Proteomic analysis revealed alterations of the *Plasmodium falciparum* metabolism following salicylhydroxamic acid exposure

Marylin Torrentino-Madamet<sup>1</sup>  
Lionel Almeras<sup>2</sup>  
Christelle Travaille<sup>1</sup>  
Véronique Sinou<sup>1</sup>  
Matthieu Pophillat<sup>3</sup>  
Maya Belghazi<sup>4</sup>  
Patrick Fourquet<sup>3</sup>  
Yves Jammes<sup>5</sup>  
Daniel Parzy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR-MD3, Université de la Méditerranée, Antenne IRBA de Marseille (IMTSSA, Le Pharo),

<sup>2</sup>Unité de Recherche en Biologie et Epidémiologie Parasitaires, Antenne IRBA de Marseille (IMTSSA, Le Pharo),

<sup>3</sup>Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de la Méditerranée,

<sup>4</sup>Centre d'Analyse Protéomique de Marseille, Institut Fédératif de Recherche Jean Roche, Faculté de Médecine Nord, <sup>5</sup>UMR-MD2, Physiologie et Physiopathologie en Conditions d'Oxygénations Extrêmes, Institut Fédératif de Recherche Jean Roche, Faculté de Médecine Nord, Marseille, France

Correspondence: Marylin Torrentino-Madamet  
UMR-MD3, Université de la Méditerranée, Antenne IRBA de Marseille (IMTSSA, Le Pharo), Allée du Médecin colonel Eugène Jamot – BP 60109, 13262 Marseille cedex 07, France  
Tel +33 491 150 114  
Fax +33 491 150 164  
Email madametm@imtssa.fr

**Objectives:** Although human respiratory metabolism is characterized by the mitochondrial electron transport chain, some organisms present a “branched respiratory chain.” This branched pathway includes both a classical and an alternative respiratory chain. The latter involves an alternative oxidase. Though the *Plasmodium falciparum* alternative oxidase is not yet identified, a specific inhibitor of this enzyme, salicylhydroxamic acid (SHAM), showed a drug effect on *P. falciparum* respiratory function using oxygen consumption measurements. The present study aimed to highlight the metabolic pathways that are affected in *P. falciparum* following SHAM exposure.

**Design:** A proteomic approach was used to analyze the *P. falciparum* proteome and determine the metabolic pathways altered following SHAM treatment. To evaluate the SHAM effect on parasite growth, the phenotypic alterations of *P. falciparum* after SHAM or/and hyperoxia exposure were observed.

**Results:** After SHAM exposure, 26 proteins were significantly deregulated using a fluorescent two dimensional-differential gel electrophoresis. Among these deregulated proteins, some were particularly involved in energetic metabolism. And the combinatory effect of SHAM/hyperoxia seems deleterious for the growth of *P. falciparum*.

**Conclusion:** Our results indicated that SHAM appears to activate glycolysis and decrease stress defense systems. These data provide a better understanding of parasite biology.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*, salicylhydroxamic acid, hyperoxia, glycolysis, proteomic

## Background

The malaria parasite *Plasmodium falciparum* possesses a mitochondrion with specific structural and physiological features.<sup>1-4</sup> Unlike most other eukaryotes, malarial mitochondrial electron transport chain (mETC) activity appears to be primarily involved in de novo pyrimidine biosynthesis through the activity of dihydroorotate dehydrogenase rather than through an adenosine triphosphate (ATP) source.<sup>4-6</sup> Intraerythrocytic stages of malaria parasites have been considered for a long time to rely primarily on anaerobic glycolysis for ATP production. However, recently five subunits of the F<sub>1</sub> subcomplex and four F<sub>0</sub> subunits of the mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase have been reported in the *P. falciparum* genome, supporting the fact that oxidative phosphorylation could be functional.<sup>7</sup> As parasite respiratory metabolism is distinct from human respiration, diverse inhibitors of the major complexes of the mETC have been used in chemotherapy<sup>8</sup> and validated the importance of the mitochondrion in the growth of the asexual intraerythrocytic stage of *P. falciparum*.<sup>9,10</sup> Moreover,

**Improvement of the efficacy of dihydroartemisinin with atorvastatin in an experimental cerebral malaria murine model**

Jérôme Dormoi<sup>1,2</sup>, Sébastien Briolant<sup>1,2,3,4</sup>, Aurélie Pascual<sup>1,2</sup>, Camille Desgrouas<sup>5</sup>,  
Christelle Travaillé<sup>5</sup>, and Bruno Pradines<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Unité de Parasitologie, Département d'Infectiologie de Terrain, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France.

<sup>2</sup>Aix Marseille Université, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, UM 63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, Marseille, France.

<sup>3</sup>Direction Interarmées du Service de Santé, Cayenne, Guyane.

<sup>4</sup>Laboratoire de Parasitologie, Institut Pasteur de la Guyane, Cayenne, Guyane.

<sup>5</sup>UMR MD3, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Marseille, France.

\*Corresponding author

Email addresses:

JD: jerome.dormoi@hotmail.fr

SB: sbriolant@wanadoo.fr

AP: aureliepascual@hotmail.com

CD: camilledesgrouas@gmail.com

CT: christelletravaille@hotmail.fr

BP: bruno.pradines@free.fr

## **Abstract**

### **Background**

The medical care of malaria is a clinical emergency because it may develop into severe malaria, which has a high risk of complications and death. One of the major complications of *Plasmodium falciparum* infections is cerebral malaria (CM), which is responsible for at least 175 000 deaths worldwide each year and has long-term neurological sequelae. Moreover, treatment for CM is only partially effective. Statins are now known to have anti-inflammatory action, to attenuate sepsis and to have neuroprotective effects. *In vitro*, atorvastatin (AVA) has an anti-malarial activity and has improved the activity of quinine (QN), mefloquine (MQ), and dihydroartemisinin (DHA).

### **Objectives**

This study had two objectives. First, the ability of AVA to enhance DHA efficacy by improving the survival rate for CM and also decreasing signs of CM was evaluated in a murine model of experimental cerebral malaria (ECM), which was designed in C57BL6/N mice. Second, the inflammatory biomarkers were assessed at D6 and D10 in mice treated by DHA and in untreated mice in which clinical signs of CM appear rapidly and death occurs before D12. Both experiments were designed with seven days of treatment with 40 mg/kg AVA combined with five days of 3 mg/kg DHA administered intraperitoneally.

### **Results**

AVA in combination with DHA in a therapeutic scheme leads to a significant delay in mouse death, and it has an effect on the onset of CM symptoms and on the level of parasitaemia. Evaluation of the biomarkers highlights the significant difference between treated and control mice for five cytokines and chemokines (Eotaxin-CCL11,

IL-13, LIX-CXCL5, MIP1b-CCL4 and MIP2) that are known to have a role in chemotaxis.

### **Conclusions**

The combination of DHA and AVA seems to be effective as a therapeutic scheme for improving mouse survival but less effective for cytokine modulation, which is associated with protection against CM. These results call for clinical trials of AVA as an adjuvant with antimalarial therapy, especially with artemisinin-based combination therapy, in CM treatment or prevention.

**Keywords:** malaria, *Plasmodium berghei*, antimalarial, resistance, in vivo, artemisinin, statin