

THÈSE

Pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université d'Aix-Marseille

Discipline : Bioinformatique et Génomique

Compréhension de la résistance humaine au paludisme : des études génétiques aux approches fonctionnelles

Présentée et soutenue publiquement par :

Sabrina BAAKLINI

Le jeudi 23 novembre 2017

Devant le Jury composé de :

Professeur Jacques VAN HELDEN

Docteur David COURTIN

Docteur Sylviane PIED

Docteur Laurence FLORI

Docteur Christophe CHEVILLARD

Professeur Pascal RIHET

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

*À mes parents,
À mon étoile, mon mur des merveilles,
À mon rayon de soleil*

*« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres,
mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres
n'est une maison »*

Henry Poincaré

RÉSUMÉ

En 2015, plus de la moitié de la population mondiale était exposé au risque de contracter le paludisme. Avec 212 millions de cas cliniques et 429000 décès enregistrés, cette maladie infectieuse multifactorielle reste un problème de santé publique majeur, principalement en Afrique subsaharienne qui compte la plupart de ces nouveaux cas et décès (environ 90 %). La sévérité et le devenir de l'infection palustre sont influencés par des interactions complexes entre de nombreux facteurs parmi lesquelles la génétique de l'hôte. En effet, les parasites du paludisme ont exercé une forte pression sélective sur le génome humain dans les zones endémiques, conduisant à l'accumulation progressive de variations génétiques touchant les globules rouges mais aussi le système immunitaire.

De nombreuses études génétiques ont été menées dans les régions endémiques afin d'identifier les différents loci impliqués dans la résistance de l'hôte au paludisme. Parmi celle-ci, une étude de liaison pangénomique conduite au Burkina Faso a permis d'identifier une liaison génétique significative entre le locus 6p21 et la forme simple du paludisme. En plus de leur liaison, plusieurs polymorphismes trouvés sous le pic de liaison, et plus précisément, au sein du TNF et du NCR3, ont été indépendamment associés à différents sous-phénotypes de la forme non compliquée du paludisme comme la parasitémie maximale ou l'accès fébrile. Parmi ces variants, on retrouve le TNF1304, le TNF-308, le TNF-238 et le NCR3-412.

Mon projet de thèse a consisté à :

- Confirmer l'association de ces polymorphismes avec la parasitémie et les accès palustres simples en les répliquant dans une population congolaise dans laquelle peu de données génétiques en relation avec les maladies infectieuses étaient disponibles.
- Caractériser leur effet cis-régulateur par des approches fonctionnelles et bio-informatiques.
- Déterminer s'il existe une association entre NCR3-412 et le paludisme sévère.

Dans une première partie nous nous sommes intéressés aux SNPs du TNF. Nos résultats montrent que les polymorphismes TNF-308, TNF-244, et TNF-238 sont associés à la parasitémie symptomatique maximale ou aux accès palustres simples. Les approches moléculaires ont permis de montrer que le TNF-244 a un effet cis-régulateur. En effet, dans les expériences de gène-rapporteur et de gel-retard, nous avons pu observer une activité du promoteur réduite en présence du variant A ainsi qu'une fixation altérée de protéines nucléaires en présence de ce même variant. De plus, nos analyses bio-informatiques suggèrent que le TNF-244 et le TNF-238 agissent en synergie pour modifier le site de fixation pour au moins un facteur de transcription dont STAT3.

Dans une seconde partie nous nous sommes intéressés au variant NCR3-412. Nous avons confirmé ici l'association de ce polymorphisme avec la forme simple du paludisme ainsi que le nombre d'accès fébrile au Congo. Les approches fonctionnelles ont également montré qu'il a un effet cis-régulateur. En outre, les résultats des expériences de gène-rapporteur et de gel-retard indiquent une activité du promoteur significativement accrue en présence de l'allèle G ainsi qu'une liaison altérée de deux complexes protéiques nucléaires en présence de l'allèle C. Enfin, après l'identification *in silico* de facteurs de transcription candidats, les expériences de pull-down/western blot ont confirmé que STAT4 et RUNX3 lient la région contenant NCR3-412 avec une plus grande affinité pour l'allèle G. Nos résultats confirment l'hypothèse selon laquelle cette variation génétique au sein d'un récepteur activateur des cellules NK altère la résistance à la forme simple du paludisme chez l'homme. Nous avons donc souhaité déterminer s'il est impliqué aussi dans la résistance au paludisme sévère dans une population sénégalaise mais nous n'avons détecté aucune association entre ce polymorphisme et l'anémie sévère ou le neuropaludisme, suggérant l'implication d'autres mécanismes.

ABSTRACT

In 2015, nearly half of the world's population was at risk of malaria. With 212 million clinical cases and 429,000 deaths recorded, this multifactorial infectious disease remains a major public health problem, mainly in sub-Saharan Africa, which accounts for most of these new cases and deaths (nearly 90 %). The severity and outcomes of malaria infection are influenced by complex interactions between many factors including host genetics. Malaria parasites have exerted a strong selective pressure on the human genome in endemic areas, leading to the progressive accumulation of genetic variations affecting the red blood cells and the immune system.

Numerous genetic studies have been conducted in endemic regions to identify the different loci involved in the host's resistance to malaria. Among them, a genome-wide linkage analysis conducted in Burkina Faso that showed a significant linkage between the 6p21 locus and mild malaria attack. In addition to their linkage, several polymorphisms found under the linkage peak, and more precisely within TNF- α (coding for a pro-inflammatory cytokine) and NCR3 (coding for an activating receptor expressed at the surface of NK cells), were also independently associated with different sub-phenotype of mild malaria such as maximum parasitaemia or febrile attacks. These variants include TNF1304, TNF-308, TNF-238 and NCR3-412.

In this thesis, we attempted to:

- confirm the association of these polymorphisms with parasitaemia and mild malaria by replicating them in a population living in the Republic of Congo, where there are limited human genetic data in relation with infectious diseases,
- characterize their cis-regulatory effect through functional and bioinformatics approaches,
- assess the association between NCR3-412 and severe malaria.

In the first part we focused on TNF polymorphisms. Among the 4 polymorphisms analyzed, we found associations between 3 of them (TNF-238, TNF-244, TNF-308) and either mild malaria attack or maximum parasitemia. Molecular

approaches showed that TNF-244 has a cis-regulatory effect. Indeed, based on a luciferase assays and gel retardation experiments, I observed a decreased promoter activity and an altered binding of nuclear proteins in the presence of the TNF-244A variant. In addition, bioinformatics analyses suggested a cooperative effect of TNF-244 and TNF-238 in modifying the binding of at least one transcription factor, including STAT3.

In the second part we looked at NCR3-412. We confirmed the association of this polymorphism with both mild malaria and the number of febrile episodes in Congo. Functional approaches have also shown that NCR3-412 has a cis-regulatory effect. Indeed, Luciferase assay and EMSA results indicated a decreased promoter activity and an altered binding of two nuclear protein complexes in the presence of the NCR3-412C allele. Finally, after in silico identification of transcription factor candidates, pull-down western blot experiments confirmed that both STAT4 and RUNX3 bind the region encompassing rs2736191 with a higher affinity for the G allele. To our knowledge, this is the first report that explored the functional role of rs2736191. These results support the hypothesis that a genetic variation within a natural killer cell activating receptor alters malaria resistance in humans.

We therefore wanted to assess whether this polymorphism is also involved in resistance to the severe forms of malaria in a Senegalese population, but we did not detect any association between NCR3-412 and neither severe anemia nor cerebral malaria, suggesting other mechanisms involved.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont au Docteur Courtin et au Docteur Pied pour avoir accepté de porter un regard critique sur ce travail, ainsi qu'au Docteur Flori, au Professeur Van Helden et au Docteur Chevillard pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Docteur Catherine Nguyen pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour sa bonne humeur, sa proximité et son investissement dans tous les événements que nous avons pu conduire avec les autres doctorants.

Je tiens tout particulièrement à remercier Pascal Rihet pour sa patience au quotidien, ses encouragements, ses précieux conseils, sa confiance à mener à bien ce projet avec une certaine autonomie. Merci pour tout ce que tu m'as apporté scientifiquement et humainement par les nombreux échanges que nous avons pu avoir ces 6 dernières années. Je tiens aussi à te remercier pour m'avoir soutenue dans tous les défis scientifiques que j'ai pu relever durant cette thèse, qu'il s'agisse des expériences, des congrès ou encore des projets plus personnels comme MT180, concours pour lequel tu t'es déplacé pour me soutenir !

J'aimerais remercier aussi l'ensemble de l'équipe pédagogique, Pascal, Christophe, Seb, Manu et les autres, pour tous les bons moments passés ensemble en TD, en correction « intensive »... Pour m'avoir montré que passer du côté obscur de la force, c'est plutôt pas mal. Je tiens particulièrement à remercier Christophe, pour son investissement et ses qualités d'enseignant (que j'ai pu apprécier du côté obscur (enseignant) et lumineux (étudiante) de la force !), merci pour tes qualités humaines, pour ta répartie sans équivalence (qui ont égayé mes journées d'enseignement), pour le co-voiturage et toutes nos discussions !

Je souhaite aussi remercier Lydie, Lolo et Mag, pour votre écoute, votre temps, votre patience, pour les corrections « *in extremis* » que vous avez toujours accepté de faire, pour l'aide précieuse à la paillassa, pour tous les conseils scientifiques et humains.

Je remercie tout particulièrement mes amis du labo, y compris ceux qui ne sont plus là. Flo, Jeanne, Marie, Lucie pour votre soutien au quotidien, les fous rires, les jeux, les GoT, les glaces, les « rumeurs », la motivation, les mouchoirs, les coucou derrière la vitre, les remplacements, les messages pour savoir si je survivais... Certes, la thèse est une aventure scientifique mais c'est avant tout une aventure humaine et sans vous l'aventure n'aurait pas été aussi géniale ! Je remercie Michel et Alex, pour leur présence (déjà dans le bureau !) et pour avoir partagé votre bonne humeur avec moi chaque jour ! Merci aussi à Audrey et ma Loulou, qui ne sont pas au labo, mais qui restent présente pour moi malgré la distance qui nous sépare. Merci à Quentin, pour m'avoir appris que mes obligations personnelles et professionnelles sont importantes, mais pas au détriment des personnes qui restent à vos côtés ! Comme quoi je suis capable d'apprendre de mes erreurs ! Et pour tous les matchs de foot que nous avons vu, ceux que j'ai raté et ceux que nous verrons, merci !

Mes pensées vont aussi à Nicole... Tu es toujours présente, dans les bons moments, mais aussi les mauvais... Et il faut dire qu'il y en a eu pas mal... Merci pour ton aide, ton réconfort, ta bonne humeur. Je t'adore !

Je remercie mon rayon de soleil, qui m'a soutenue et supportée (surtout ces dernières semaines de rédaction durant lesquelles et bien, je n'étais pas un vrai rayon de soleil), pour les moments inédits et insolites que tu me fais vivre, et qui rendent mon quotidien unique et moins monotone ... Pour les moments moins agréables aussi, qui nous font prendre conscience de la sincérité de nos sentiments l'un envers l'autre... Merci pour ton aide, ta présence et ton amour.

Je tiens à remercier mes tous premiers et plus fervents admirateurs, pour leur confiance sans faille quels que soient mes choix (et même celui de faire une thèse !), leur présence à mes côtés, présence sans laquelle je ne serais jamais arrivée jusqu'au bout, sans laquelle je n'aurais jamais traversé toutes ses épreuves. Maman, Papa : merci d'avoir toujours été là et d'avoir fait de moi une battante, une personne qui va jusqu'au bout quelles que soient les difficultés.

Enfin, j'aimerais terminer ces remerciements en exprimant tout mon amour à ma fille Estelle... Merci pour ton courage, ta patience pendant ces longues semaines où je n'étais pas disponible, pour les bisous d'encouragement et les câlins de réconfort, et les petits cafés que tu as pris le temps de me préparer... Je t'aime.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	5
ABSTRACT.....	7
REMERCIEMENTS.....	10
Liste des figures.....	15
Liste des tableaux.....	17
Liste des abréviations.....	18
INTRODUCTION.....	23
LE PALUDISME.....	25
A. Le paludisme à travers l'histoire.....	25
1. De l'aube de l'humanité.....	25
2. À nos jours.....	30
B. Les protagonistes.....	33
1. Le vecteur.....	34
2. L'agent pathogène.....	36
3. Cycle et transmission de Plasmodium.....	39
3.1 Cycle sexué chez l'hôte définitif.....	41
3.2 Cycle asexué chez l'homme.....	41
3.2.1 Stade Hépatique.....	41
3.2.2 Stade Érythrocytaire.....	44
3.3 Transmission de l'hôte au moustique.....	46
C. Les manifestations cliniques.....	47
1. Paludisme asymptomatique.....	47
2. Accès palustre simple.....	50
3. Paludisme sévère.....	55
3.1 Neuropaludisme.....	55
3.2 Anémie sévère.....	59
3.3 Détresse respiratoire.....	60
4. Facteurs déterminant la sévérité de l'infection palustre.....	61
LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE L'HÔTE.....	69
A. Réponse immunitaire adaptative.....	73
1. Immunité à médiation cellulaire.....	74
2. Immunité à médiation humorale.....	85
B. Réponse immunitaire innée.....	91
1. Les cellules dendritiques.....	91
2. Les monocytes / macrophages.....	98
3. Les cellules $\gamma\delta$	99
4. Les cellules NKT.....	101
5. Les cellules NK.....	102
GÉNÉTIQUE HUMAINE ET RÉSISTANCE AU PALUDISME.....	112
A. Gènes impliqués dans la résistance aux accès palustres simples.....	115
B. Gènes impliqués dans le contrôle de la parasitémie.....	116
C. Gènes impliqués dans la résistance aux formes sévères du paludisme.....	120
OBJECTIFS ET JUSTIFICATION DU PROJET.....	129
Objectifs généraux et justification du projet.....	131
Objectifs détaillés.....	135
RÉSULTATS.....	137
Résultat 1 : Analyse d'association et caractérisation fonctionnelle de variants du TNF avec la parasitémie maximale symptomatique et les accès palustres simples dans une population du Congo.....	141

Résultat 2 : Analyse d'association et caractérisation fonctionnelle d'un variant du NCR3 avec les accès palustres simples dans une population du Congo.....	155
Résultat 3 : Analyse d'association du variant NCR3 -412 avec les accès palustres graves dans une cohorte sénégalaise.....	175
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	203
A.Analyse d'association et caractérisation fonctionnelle de variants du TNF avec la parasitémie maximale symptomatique et les accès palustres simples dans une population du Congo.....	205
1.Les polymorphismes du <i>TNF</i> sont-ils retrouvés associés dans la population du Congo ?.....	206
2.Quel rôle fonctionnel pour les variants <i>TNF-244</i> et <i>TNF-238</i> ?.....	208
B.Caractérisation fonctionnelle et Analyse d'association d'un variant du NCR3 avec les accès palustres simples et sévères.....	210
1.Le variant <i>NCR3-412</i> est-il fonctionnel et quelle est sa relation avec le phénotype de résistance ? .	214
2.L'association du variant <i>NCR3-412</i> à la résistance au accès palustre simple est-elle répliquée dans la population du Congo ?.....	216
3.Le variant <i>NCR3-412</i> n'est pas associé au paludisme sévère dans la population sénégalaise : est-il possible qu'il soit tout de même un variant causal ?.....	219
CONCLUSION.....	225
BIBLIOGRAPHIE.....	231
Thesis resume.....	299
Résumé de la thèse.....	300

Liste des figures

- Figure 1 : Fossile de diptère et forme pré-parasitaire de *Plasmodium* conservé dans de l'ambre.
- Figure 2 : Fossile de moustique et de *Plasmodium dominicana* conservé dans de l'ambre.
- Figure 3 : Pays d'endémie palustre en 2000 et 2016.
- Figure 4 : Répartition géographique des vecteurs palustres d'importance majeur
- Figure 5 : Répartition géographique de *P. falciparum* et *P. vivax* en 2016.
- Figure 6 : Répartition géographique de *P. ovale* et *P. malariae* en 2016.
- Figure 7 : Répartition géographique de *P. knowlesi* en 2014.
- Figure 8 : Cycle simplifié du développement de *Plasmodium* chez l'hôte intermédiaire et définitif.
- Figure 9 : Cycle exo-érythrocytaire de *Plasmodium*.
- Figure 10 : Cycle érythrocytaire asexué de *Plasmodium*.
- Figure 11 : Lien entre la parasitémie et les accès palustres.
- Figure 12 : Mécanismes d'induction de la fièvre palustre.
- Figure 13 : Mécanismes liés à la cytoadhérence à l'origine du paludisme sévère.
- Figure 14 : Facteurs déterminant la sévérité du paludisme humain.
- Figure 15 : Réponse immunitaire dirigée contre les stades pré-érythrocytaires.
- Figure 16 : Réponse immunitaire dirigée contre les stades érythrocytaires.
- Figure 17 : Mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale dirigée contre les stades érythrocytaires.

- Figure 18 : Signaux activateurs et inhibiteurs liés aux interactions KIR-HLA.
- Figure 19 : Mécanismes moléculaires de reconnaissance de cellules pathologiques par les cellules NK.
- Figure 20 : Structure des haplotypes dans les populations africaines et non africaines.
- Figure 21 : Imputation et choix du panel de référence dans les populations africaines à haute diversité haplotypique.
- Figure 22 : Analyse de liaison pangénomique au Burkina Faso.
- Figure 23 : Zone de recrutement de la population congolaise.
- Figure 24 : Stratégie de recherche in silico de facteurs de transcription candidats.
- Figure 25 : Fixation de protéines nucléaires à la séquence présentant les variants *TNF-244/TNF-238* et prédiction in silico de facteurs de la transcription candidats correspondants aux profils du gel retard.
- Figure 26 : Distinction entre association génétique et relation causale dans les études d'association génétique.
- Figure 27 : Modèle biologique illustrant la fonction cis-régulatrice synergique des variants *TNF- 244/TNF-238*.
- Figure 28 : Hypothèses fonctionnelles de réponses cytotoxiques.
- Figure 29 : Hypothèses fonctionnelles de réponses cytokiniques.
- Figure 30 : Modèle biologique décrivant l'effet modulateur hypothétique de l'âge sur l'association du *NCR3-412* avec la forme simple du paludisme
- Figure 31 : Du portage asymptomatique aux accès sévères : implication potentielle du gène *NCR3*.
- Figure 32 : Du portage asymptomatique aux accès sévères : implication potentielle *du gène TNF*.

Liste des tableaux

- Tableau 1 : Exemples de critères utilisés pour définir les patients atteints de paludisme asymptomatiques.
- Tableau 2 : Manifestations cliniques des accès sévères à Plasmodium falciparum chez les adultes et les enfants et les fréquences associées
- Tableau 3 : Gènes/molécules impliquées dans la fonction des NK retrouvés dans les études de liaison et d'association génétique

Liste des abréviations

A. aquasalis : *Anopheles aquasalis*

ACT : Thérapie combinée à l'artémisinine

ADCC : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps

ADCI : Inhibition cellulaire dépendante des anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMA-1 : Apical membrane antigen 1

ATPase : Adénosine triphosphatase

Cas 9 : CRISPR associated protein 9

CD81 : Cluster of differentiation 81

CDPK6 : Calcium-dependant protein kinase 6

CeTOS : Cell-traversal protein for *Plasmodium* ookinetes and sporozoites

CHMI : Controlled human malaria infection

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellule présentatrice de l'antigène

CSP : Protéine circumsporozoïte

CR : Récepteur du complément

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DDT : Dichloro diphényl trichloro-éthane

DVS : Dominant vector species

EBA-175 : Erythrocyte binding antigen 175

EEF : Exo-erythrocytic form

EEF2 : Eukaryotic elongation factor 2

EPCR : Endothelial protein C receptor

EPO : Érythropoïétine

EphA2 : Ephrin type-A receptor 2
GEST : Gamete egress and sporozoite traversal
GPI : glycosylphosphatidylinositol
G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase
HSPG : Héparanes sulfates protéoglycanes
HRF : Histidin releasing factor
ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
KO : Knock-out
LFA1 : Lymphocyte function-associated antigen
LSA-1 : liver stage antigen-1
L α : Lymphotoxine α
MAC/PF : Membrane attack complex / Perforin
MCP : Macrophage chemotactic protein
MSP : Merozoite surface protein
NO : Oxyde nitrique
OMS : Organisation mondiale de la santé
Pba : *Plasmodium berghei* ANKA
P.berghei : *Plasmodium berghei*
P. chabaudi : *Plasmodium chabaudi*
P. falciparum : *Plasmodium falciparum*
P. knowlesi : *Plasmodium knowlesi*
P. malariae : *Plasmodium malariae*
P. ovale : *Plasmodium ovale*

P. o. curtisi : *Plasmodium ovale curtisi*

P. o. wallikeri : *Plasmodium ovale wallikeri*

P. vivax : *Plasmodium vivax*

P. yoelii : *Plasmodium yoelii*

PAMP : Motif moléculaire associé aux pathogènes

PCA : Protéine C activée

PCR : Polymerase chain reaction

PD-1 : Programmed cell death 1

PGE2 : prostaglandine E2

PLP1 : Perforin-like protein 1

PfATP4 : *P. falciparum* Ca²⁺ ATPase 4

PfCDPK5 : *P. falciparum* calcium-dependent protein kinase 5

PfCYRPA : *P. falciparum* cysteine-rich protective antigen

PfEMP1 : *P. falciparum* erythrocyte membrane protein I

PfPKG : *P. falciparum* cGMP-dependent protein kinase

PfRH5 : *P. falciparum* reticulocyte-binding protein homolog 5

PfRipR : *P. falciparum* RH5-interacting protein

PfSPZ : *P. falciparum* sporozoïtes

PfSPZ-Cvac : *P. falciparum* sporozoïtes - chloroquine vaccination

RON2 : Rhoptry neck protein 2

SDRA : Syndrome de détresse respiratoire aiguë

SPECT : Sporozoite microneme protein essential for cell traversal

SR-B1 : Scavenger receptor class B type I

STARP : Sporozoite threonine and asparagine-rich protein

TGF : Transforming growth factor

Tfh : lymphocyte T folliculaire

TLP : *Trap-like protein*

TLR : Toll-like receptor

TNF : Tumor necrosis factor

TRAP : Thrombospondin-related anonymous protein

TSR : Thrombospondin type 1 repeat

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine 1

INTRODUCTION

LE PALUDISME

A. LE PALUDISME À TRAVERS L'HISTOIRE

« Des espèces, des races se sont éteintes, d'autres ont évolué. Et, si nous ne pouvons faire la preuve de l'existence de maladies anciennes, aujourd'hui disparues, du moins restons-nous rêveurs devant la continuité de certaines affections dont le temps, les milieux, le passage sur les êtres les plus divers n'ont pu modifier les caractères. » Léon Pales (1905-1988).

1. DE L'AUBE DE L'HUMANITÉ...

Il est dit du paludisme qu'il est aussi vieux que le monde et qu'il a influencé le cours de l'histoire de l'humanité à de nombreuses reprises, faisant des victimes parmi rois, conquérants, chefs militaires, membres du clergé et gens du peuple. Mais qu'en est-il réellement ? Quand est apparu le parasite responsable du paludisme ? À partir de quand a-t-il infecté l'homme et s'est-il répandu ? Quelles traces historiques cette maladie infectieuse a-t-elle laissée ? Comment a-t-elle influencé le cours de l'histoire ? Et quelles découvertes majeures les scientifiques ont pu faire au cours du temps ?

Les questions quand et chez qui, de l'hôte ou du vecteur, l'ancêtre du parasite palustre est apparu, sont très controversées. Certains situeraient son apparition à 1,5 milliard d'années, dès lors que de potentiels hôtes à parasiter seraient apparus ([Carter & Mendis, 2002](#)). Mais les premières traces biologiques de formes pré-parasitaires palustres (*Paleohaemoproteus burmasicus*) sont retrouvées dans l'abdomen d'un fossile de diptère (*Protoculicoides*) conservé dans de l'ambre et datant du Crétacé (Fig. 1) ; ce qui situerait son apparition à au moins 100 millions d'années ([G. Poinar & Telford, 2005](#) ; [George Poinar, 2016](#)). D'autres espèces, plus récentes (environ 15 millions d'années) ont été également retrouvées dans des fossiles de moustiques (*Culex malariager*), notamment *Plasmodium dominicana* en République Dominicaine (Fig.2) ([George Poinar, 2005](#)). Les reptiles auraient été les premiers hôtes de *Plasmodium* qui aurait ensuite évolué et infecté les autres espèces vivantes ([S. R. T. Jr, 2008](#); [Yotoko & Elisei, 2006](#)).

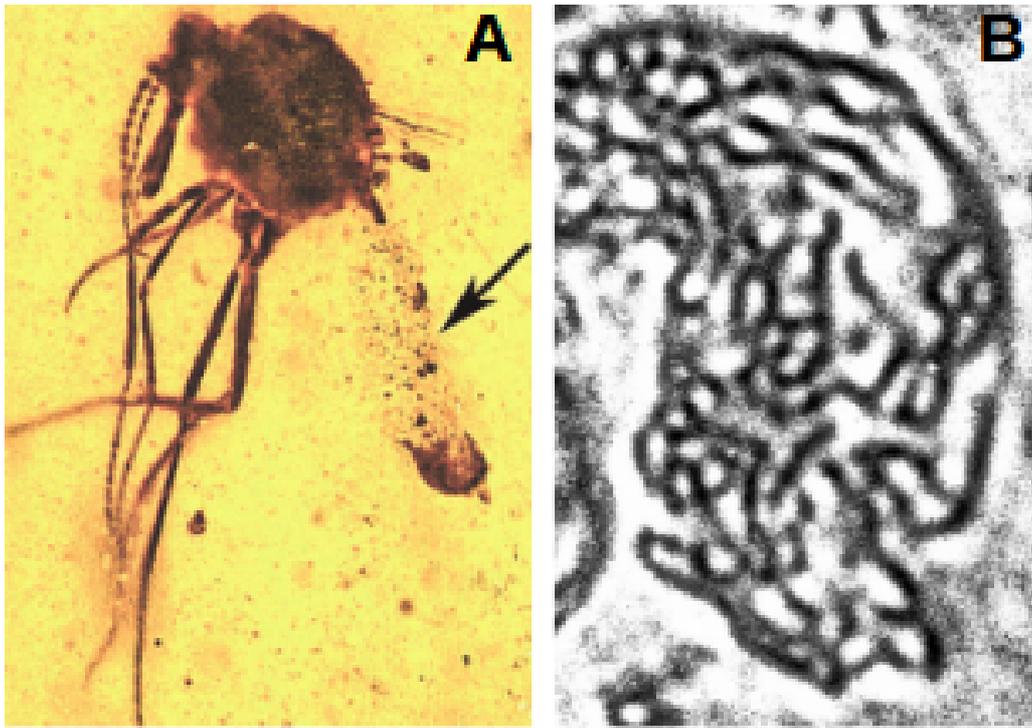


Fig. 1. Fossile de diptère et forme pré-parasitaire de *Plasmodium* conservé dans de l'ambre. A. Fossile de *Protoculicoides* datant de 100 millions d'années, contenant dans son abdomen, de nombreux oocystes (flèche) du proto-parasite palustre *Paleohaemoproteus burmavis* conservé dans de l'ambre. B. Détail des sporozoïtes de *Paleohaemoproteus burmavis*. (George Poinar, 2016)

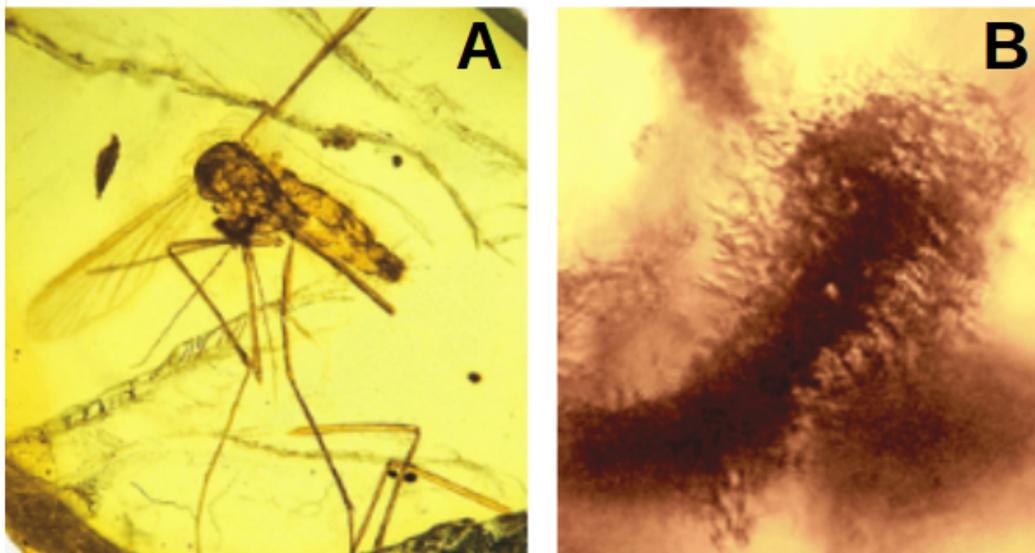


Fig. 2. Fossile de moustique et de *Plasmodium dominicana* conservé dans de l'ambre. A. Fossile de *Culex malariager* datant de l'ère tertiaire, infecté par le parasite palustre *Plasmodium dominicana*. B. Sporozoïtes de *Plasmodium dominicana* émergeant d'oocystes matures présents dans la cavité abdominale de *Culex malariager*. (George Poinar, 2016)

Chez l'homme, les espèces responsables du paludisme proviendraient des parasites du gorille (pour *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*) et du chimpanzé (pour toutes les espèces exceptée *Plasmodium falciparum*), et se seraient répandues il y a environ 10000 ans avec le début de la sédentarisation (Carter & Mendis, 2002; Loy et al., 2017).

Quant aux premières traces historiques faisant références aux manifestations du paludisme et à leurs causes « surnaturelles », elles remontent à l'antiquité et sont décrites par de nombreuses civilisations (Carter & Mendis, 2002; F. E. G. Cox, 2002; Retief & Cilliers, 2006). Elles sont évoquées dans un traité de médecine traditionnelle chinoise datant de 2700 ans avant J.-C. (le *Nei Ching*) qui relate des fièvres avec élargissement de la rate attribuées à 3 démons : un portant un marteau (en référence aux maux de tête), un autre portant un seau d'eau (en référence aux sueurs), et un troisième entretenant un four brûlant (en référence à la fièvre) (Bruce-Chwatt, 1988).

On retrouve aussi des inscriptions cunéiformes mésopotamiennes sur des tablettes d'argile datant de 2000 ans avant J.-C. qui attribuent l'apparition de la maladie à Nergal, dieu babylonien représenté par un insecte volant ressemblant au moustique (Bruce-Chwatt, 1965; Francis E. G. Cox, 2004). Des textes védiques et brahmaniques du nord de l'Inde (1500-800 avant J.-C.) la qualifie de « Reine des maladies » provoquée par le Dieu Shiva. Et monuments et écrits de l'Égypte ancienne, dont le papyrus Ebers rédigé à Louxor en 1570 avant J.-C., y font référence comme à une maladie associant fièvre, frissons et splénomégalie. La validité de ces dernières observations est confirmée par différentes découvertes scientifiques ; à savoir la présence d'antigènes plasmodiaux ou encore d'ADN ribosomal 18S spécifique du parasite dans des momies datant de 3200 à 1300 ans avant J.-C., y compris la momie de Toutankhamon (Hawass et al., 2010; Lalremruata et al., 2013; R. L. Miller et al., 1994; Nerlich, Schraut, Dittrich, Jelinek, & Zink, 2008).

Ce n'est qu'aux alentours du 5^{ème} siècle avant J.-C. en Grèce, qu'Hippocrate définit différentes formes cliniques du paludisme en fonction de la périodicité des fièvres : *febris tertiana* (tous les trois jours), *quartana* (tous les quatre jours) et *quotidiana*. Il relève aussi une corrélation entre ces fièvres intermittentes et les zones marécageuses où l'on pensait que l'air était vicié (Bruce-Chwatt & De

Zulueta, 1980; Cunha & Cunha, 2008; Sallares, 2002). Cette dernière croyance explique l'étymologie des diverses dénominations de la maladie : paludisme, dérivé du latin *paludis*, signifiant marais ; malaria, la dénomination anglophone, dérivée de l'italien *mal'aria*, faisant référence aux miasmes dont on pensait qu'ils occasionnaient les fièvres (Robert S. Desowitz, 1991).

Le paludisme atteint la Rome antique au 2^{ème} siècle avant J.-C., avec l'arrivée des soldats carthaginois du général Hannibal Barca, au cours de la seconde guerre punique (Celli & Celli-Fraentzel, 1933). Néanmoins, l'apogée de l'Empire Romain permet le drainage des zones marécageuses et le déclin du paludisme. Mais dès sa chute (au 5^{ème} siècle après J.-C.), les marais réapparaissent et la maladie se manifeste à nouveau, reflétant ainsi la dépendance du paludisme à l'activité humaine et au style de vie (Carter & Mendis, 2002). Le parasite se répand ensuite à travers l'Europe où il a fait des ravages comparables à ceux qu'il cause en Afrique aujourd'hui, puis au 16^{ème} siècle, suite à la conquête du Nouveau Monde et le commerce d'esclaves, il atteint les Amériques (Schlagenhauf, 2004).

La seconde guerre punique n'est pas le seul cours de l'histoire que le paludisme ait bouleversé. De nombreux guerriers y ont succombé après avoir quitté le front. Et dans de nombreux conflits, plus de troupes ont été anéanties par le paludisme que par le combat. En 1167, par exemple, l'armée de Frédéric Ier de Hohenstaufen, dit Frédéric Barberousse, est décimée par le paludisme, ce qui le contraint à rentrer en Allemagne (Nicholas, 2014; Sallares, 2002). Au cours de la guerre d'indépendance américaine, le paludisme touche autant les troupes britanniques qu'américaines (Earle, 1979; Russell, 1968). Et au cours de la 1^{ère} Guerre Mondiale, au moins 1,5 million de soldats sont infectés, avec une mortalité allant de 0,2 à 5 % (Brabin, 2014). Les ravages causés par le paludisme durant ces guerres ont, en contrepartie, stimulé la recherche scientifique ; dans un premier temps pour mieux le comprendre et dans un second temps pour mieux le traiter.

Ainsi, en 1880, Charles Louis Alphonse Laveran, médecin militaire français, met en évidence l'agent responsable du paludisme dans le sang de ses patients ; découverte confirmée par Osler (en 1882), Abott (en 1885) et Sternberg (en 1886). En 1886, Camillo Golgi, neurophysiologiste italien, nomme plus précisément *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae*, deux espèces

responsable du paludisme humain. Cette découverte est suivie en 1889, par la description du parasite humain responsable des formes sévères : *Plasmodium falciparum* par Celli et Marchiafava ; et en 1922 de *Plasmodium ovale* par Stephens (J. W. W. Stephens, 1922). Des premiers cas isolés de paludisme humain causé par un parasite simien, *Plasmodium knowlesi*, sont observés en Malaisie en 1965, mais ce n'est qu'en 2004 que ce parasite est reconnu comme la cinquième espèce responsable d'infections humaines (Chin, Contacos, Coatney, & Kimball, 1965; Jongwutiwes, Putaporntip, Iwasaki, Sata, & Kanbara, 2004; B. Singh et al., 2004).

Les découvertes relatives au vecteur et au cycle du parasite débutent avec Patrick Manson qui, en 1894, émet l'hypothèse que le moustique transmet le parasite à l'homme. Ses hypothèses sont démontrées par son élève Ronald Ross, un autre médecin militaire. Ce dernier remarque en 1897, des oocystes dans les glandes salivaires d'un moustique, puis, l'année suivante la transmission de sporozoïtes aviaires par des anophèles infectés à des oiseaux. Au même moment, trois chercheurs italiens Giovanni Battista Grassi, Amico Bignami et Giuseppe Bastianelli décrivent les étapes de développement du parasite humain dans le moustique (Bruce-Chwatt, 1988; Capanna, 2006; F. E. G. Cox, 2002; Yoeli, 1973).

Quant aux recherches de traitement et moyen de lutte antipaludique, elles débutent en 1820 avec Pelletier et Caventou qui isolent la molécule de quinine à partir d'écorces de quinquina. Cet arbre originaire du Pérou était utilisé par les indiens pour traiter les fièvres. Ses propriétés curatives furent découvertes lors de la conquête du Nouveau Monde en 1630 par des missionnaires jésuites (Meshnick & Dobson, 2001).

En 1891, Paul Ehrlich découvre un composé synthétique toxique pour le *Plasmodium* : le bleu de méthylène (Krafts, Hempelmann, & Skórska-Stania, 2012). Mais ce sont les première et seconde guerres mondiales, qui vont jouer un rôle déterminant dans le développement d'antipaludéens de synthèse, à savoir la chloroquine, la sulfadoxine-pyriméthamine ou encore la méfloquine, et ceci dû à l'occupation des principales régions où sont retrouvés le quinquina par l'une ou l'autre des armées (Meshnick & Dobson, 2001).

Parallèlement, les stratégies de lutte anti-vectorielles sont développées. Ainsi, en 1939, Muller découvre les propriétés insecticides du DDT (Dichloro Diphényl

Trichloro-éthane), un composé synthétisé pour la première fois en 1874 par Othmar Zeidler, un chimiste autrichien ([Metcalf, 1973](#)).

L'efficacité conjointe de la chloroquine et du DDT conduit l'OMS à lancer en 1955, un programme mondial d'éradication du paludisme. Malgré l'éradication de la maladie dans de nombreux pays, il est abandonné en 1969 ([Trigg & Kondrachine, 1998](#); [WHO, 2008](#)) au vu de la résistance croissante de *Plasmodium* à la chloroquine dans différentes régions du monde ([Harinasuta, Suntharasamai, & Viravan, 1965](#); [Moore & Lanier, 1961](#)) et celle des moustiques au DDT ([Raghavendra, Barik, Reddy, Sharma, & Dash, 2011](#)).

La résurgence du paludisme et l'augmentation rapide de la mortalité due à une perte d'efficacité des traitements antipaludéens donne naissance en 1969, à un nouveau projet chinois de contrôle du paludisme : le projet 523. En 1972, après avoir entrepris une étude systématique de plus d'une centaine de plantes médicinales chinoise, Tu Youyou, la responsable scientifique de ce projet et son équipe mettent en évidence les propriétés antipaludiques de l'artémisinine. Cette molécule, issue du Qinghao, a pour la première fois été décrite pour son action sur les symptômes du paludisme par Ge Hong vers 317-420 après J.-C ([Tu, 2016](#)).

Ainsi, dès 2001, l'OMS recommande une nouvelle thérapie : l'ACT qui consiste à combiner l'artémisinine, avec un ou deux autres antipaludéens. Les ACT montrent une grande efficacité ([Nosten et al., 2000](#)). Mais, assez rapidement des résistances à ce nouveau traitement apparaissent en Asie ([Phyo et al., 2016](#)).

2. À NOS JOURS

Aujourd'hui, grâce aux différentes découvertes scientifiques ayant permis une meilleure compréhension de la maladie, du parasite, de son vecteur et de l'hôte, et grâce aux moyens déployés dans la lutte contre le paludisme au niveau de la recherche scientifique et des mesures engagées par les différentes institutions mondiales (notamment, l'accessibilité aux moustiquaires imprégnées d'insecticide, l'intensification rapide des tests de diagnostic et une plus grande disponibilité des médicaments antipaludiques), le nombre de cas de paludisme enregistré dans le monde entre 2000 et 2015 a diminué de 18 % et la mortalité y étant associée a quant à elle diminué de 48 % ([Nation Unis, 2015](#); [WHO, 2016a](#)).

Quatre-vingt-onze pays et territoires sont aujourd’hui considérés comme endémiques pour le paludisme contre 108 en 2000 (Fig. 3).

Malgré ce recul, le paludisme reste un immense fardeau de santé publique avec 212 millions de cas et 429 000 décès associés en 2015. L’Afrique est la région la plus impactée avec 88 % des cas et des décès liés au paludisme, suivie par l’Asie du sud-est (10 %), la Méditerranée orientale (2 %) et l’Amérique centrale et du sud (<1%). En Afrique, la population n’ayant pas accès aux outils permettant de prévenir et de traiter la maladie se compte encore par millions.

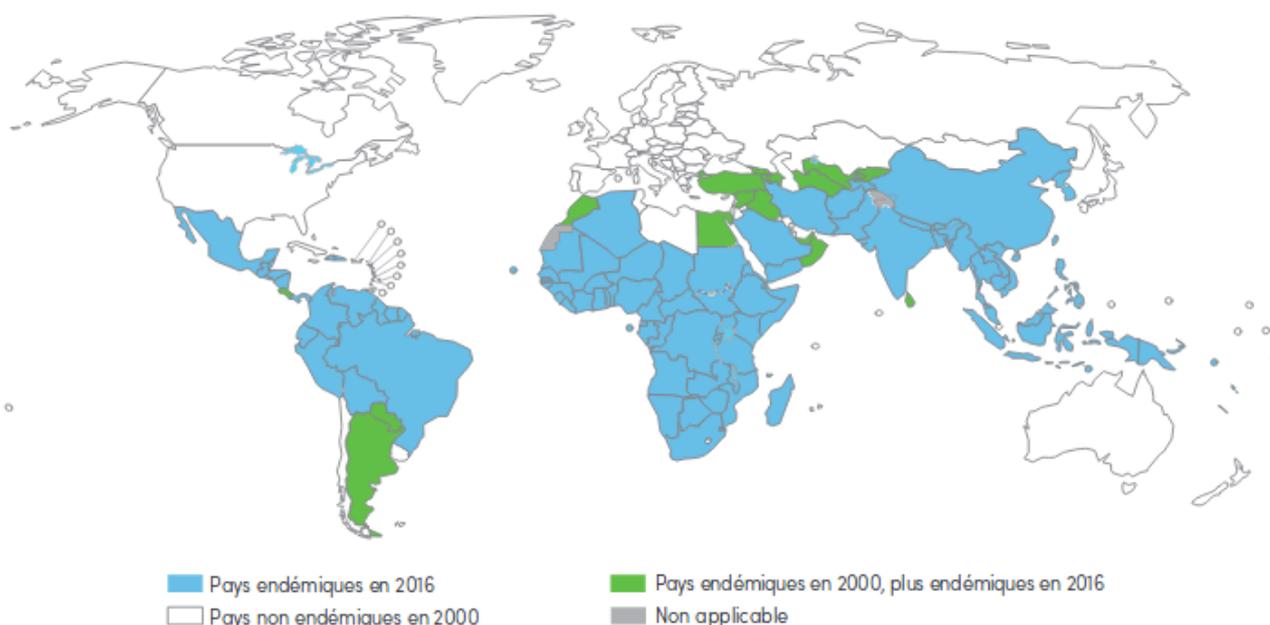


Fig. 3. Pays d'endémie palustre en 2000 et 2016. D'après (WHO, 2016b)

Mais qu'en est-il des avancées et perspectives scientifiques contemporaines dans la lutte antipaludique ?

Trois axes majeurs sont ciblés :

- le contrôle des vecteurs : La modification des capacités du moustique en tant que réservoir est devenue la piste privilégiée dans la stratégie de contrôle des vecteurs. Avec l'avènement des technologies d'édition du génome de type CRISPR-Cas9, deux approches principales ont pu être envisagées et développées : la méthode de suppression des populations de moustiques, par laquelle les moustiques sont modifiés de sorte que toute progéniture soit stérile (Black, Alphey, & James, 2011; Bourtzis, Lees, Hendrichs, & Vreysen, 2016; Hammond *et al.*, 2016) ; et la méthode

d'altération des populations de moustiques, par laquelle les moustiques sont modifiés de sorte que la descendance soit réfractaire à l'infection à *Plasmodium* (Burt, 2014; Conduct, Sciences, Studies, & National Academies of Sciences, 2016; Gantz *et al.*, 2015). Une autre approche s'inspire de la découverte que les moustiques *Aedes aegypti* (vecteur de la Dengue, de la fièvre jaune et du virus Zika) infectés naturellement par des bactéries appartenant au genre *Wolbachia* ne peuvent pas transmettre le virus de la Dengue aux hôtes humains (Bull & Turelli, 2013). Ainsi, le symbiote *Wolbachia* pourrait être modifié afin de le rendre nuisible à d'autres parasites au sein du même vecteur, et d'autres symbiotes pourraient coloniser les moustiques *Anopheles* et nuire au *Plasmodium* (S. Wang *et al.*, 2012; Wilke & Marrelli, 2015).

- les traitements anti-palustres : la nécessité de développer de nouvelles thérapies face à la résistance croissante de *P. falciparum* et *P. vivax* aux traitements actuels, a entraîné le développement de partenariats public-privé et l'utilisation d'approches haut-débit afin d'identifier de nouvelles molécules pharmacologiques et leurs cibles potentielles. Ainsi, en 2009, GlaxoSmithKline met à disposition de la communauté scientifique, près de 2 millions de composés potentiellement actifs contre *P. falciparum* (Gamo *et al.*, 2010). Parmi ceux-là, 13 533 ont montré une activité inhibitrice de la croissance du parasite. Ces approches de « cellomique » ont permis entre autres d'identifier le Cipargamin (actuellement en essai clinique), un composé liant la pompe à sodium ATPase (PfATP4) exprimée sur la membrane plasmique du parasite, qui, en rompant l'homéostasie du sodium bloque le développement des formes asexuées sanguines du parasite et sa transmission au moustique (Spillman *et al.*, 2013) ; ou encore le composé DDD107498 qui lui, cible un facteur d'élongation de la traduction (EEF2) de *P. falciparum* et est actif contre de nombreuses étapes du cycle du parasite (Baragaña *et al.*, 2015).
- la vaccination : un vaccin idéal contre le paludisme ciblerait des antigènes conservés entre les différentes espèces et souches de *Plasmodium* afin d'induire une protection stérile permanente. Mais, la complexité de *Plasmodium* rend cette conception de vaccin idéal inaccessible. En effet, la plupart des antigènes parasitaires sont très polymorphes, et ceux qui sont

conservés pourraient être peu immunogènes. La recherche actuelle de vaccin vise donc spécifiquement les espèces les plus répandues et dangereuses de *Plasmodium* (i.e *P. falciparum* et *P. vivax*) (Birkett, 2016). Ces vaccins utilisent des antigènes protéiques recombinants qui ciblent différentes phases du cycle de vie parasitaire. Le vaccin en stade clinique le plus avancé (phase III, et un projet pilote visant à vacciner 720000 enfants au Kenya, au Ghana et au Malawi d'ici 2020) est le RTS, S/ASO1. Ce vaccin contient une protéine recombinante de stade pré-érythrocytaire composé d'antigènes de la protéine circumsporozoïte de *P. falciparum* et de l'hépatite B. L'essai clinique de phase III du RTS,S/ASO1 montre que, malgré la diminution de moitié du nombre d'accès chez les enfants âgés de 5 à 17 mois la première année suivant l'administration des 3 premières doses, l'efficacité passe à seulement 26 % à l'issue de l'essai clinique (soit 48 mois après vaccination). Le RTS,S/ASO1 n'agit donc pas au long terme (Greenwood & Doumbo, 2016; Mahmoudi & Keshavarz, 2017; RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015). Une autre piste vaccinale couplant l'administration de chloroquine à celle de sporozoïtes vivants atténués, le PfSPZ-Cvac (*P. falciparum* sporozoïtes - chloroquine vaccination), a montré un niveau de protection élevé lors d'une étude clinique dans laquelle 3 groupes de 9 volontaires ont été soumis à une infection palustre contrôlée (CHMI) après avoir reçu 3 doses différentes de vaccin. Les 9 volontaires du groupe ayant reçu 3 injections de 5.12×10^4 PfSPZ ont montré une immunité protectrice complète pendant 10 semaines (Mordmüller *et al.*, 2017).

B. LES PROTAGONISTES

Le paludisme est une maladie infectieuse causée par des parasites protozoaires du genre *Plasmodium* qui sont transmis par la piqûre d'un moustique femelle infecté du genre *Anopheles* lors de son repas sanguin. La sévérité de la maladie dépend de multiples facteurs liés aux différents protagonistes : l'hôte, le vecteur et le parasite. Ces facteurs et leur impacts seront développés dans un chapitre ultérieur.

1. LE VECTEUR

Il existe environ 500 espèces différentes de moustiques Anopheles dont 70 peuvent transmettre le paludisme à l'homme. Parmi celles-ci, seulement 41 sont considérées comme des vecteurs d'importance majeure (DVS : Dominant Vector Species), c'est-à-dire responsables de la majorité des infections humaines (Autino, Noris, Russo, & Castelli, 2012). Ce qui rend ces derniers plus dangereux sont :

- une durée de vie plus longue (permettant au parasite de finir son développement)
- une plus grande robustesse face au changement climatiques
- leur caractère anthropophile (c'est-à-dire leur propension à effectuer leur repas sanguin préférentiellement sur l'homme plutôt que sur l'animal)
- leur caractère endophile (c'est-à-dire leur propension à effectuer leur repas et se reposer à l'intérieur des habitations)

Seules les femelles Anopheles sont hématophages et transmettent la maladie. Ces dernières se nourrissent de repas sanguin nocturnes (principalement du crépuscule au lever du jour), afin de procurer protéines essentielles au développement de leurs œufs. Les larves d'anophèles se développent ensuite dans les collections d'eau, principalement eau douce non polluée. Ainsi, en fonction de la nature des sols, de la fréquence des pluies, de la température, la végétation naturelle ou encore l'exploitation de l'environnement par l'homme comme l'agriculture, ces collections d'eau seront plus ou moins propices au développement des espèces vectrices (WHO, 2013).

Leur attraction par l'hôte humain serait quant à elle déterminée par l'émanation par l'hôte de différents stimuli chimiques et odorants. Ces stimuli seraient une conséquence de la capacité du parasite palustre à modifier l'émission de facteurs chimiques par l'hôte afin d'attirer le moustique et se propager (Correa, Coronado, Garrido, Durant-Archibold, & Spadafora, 2017; De Moraes *et al.*, 2014; Kelly *et al.*, 2015; Lacroix, Mukabana, Gouagna, & Koella, 2005).

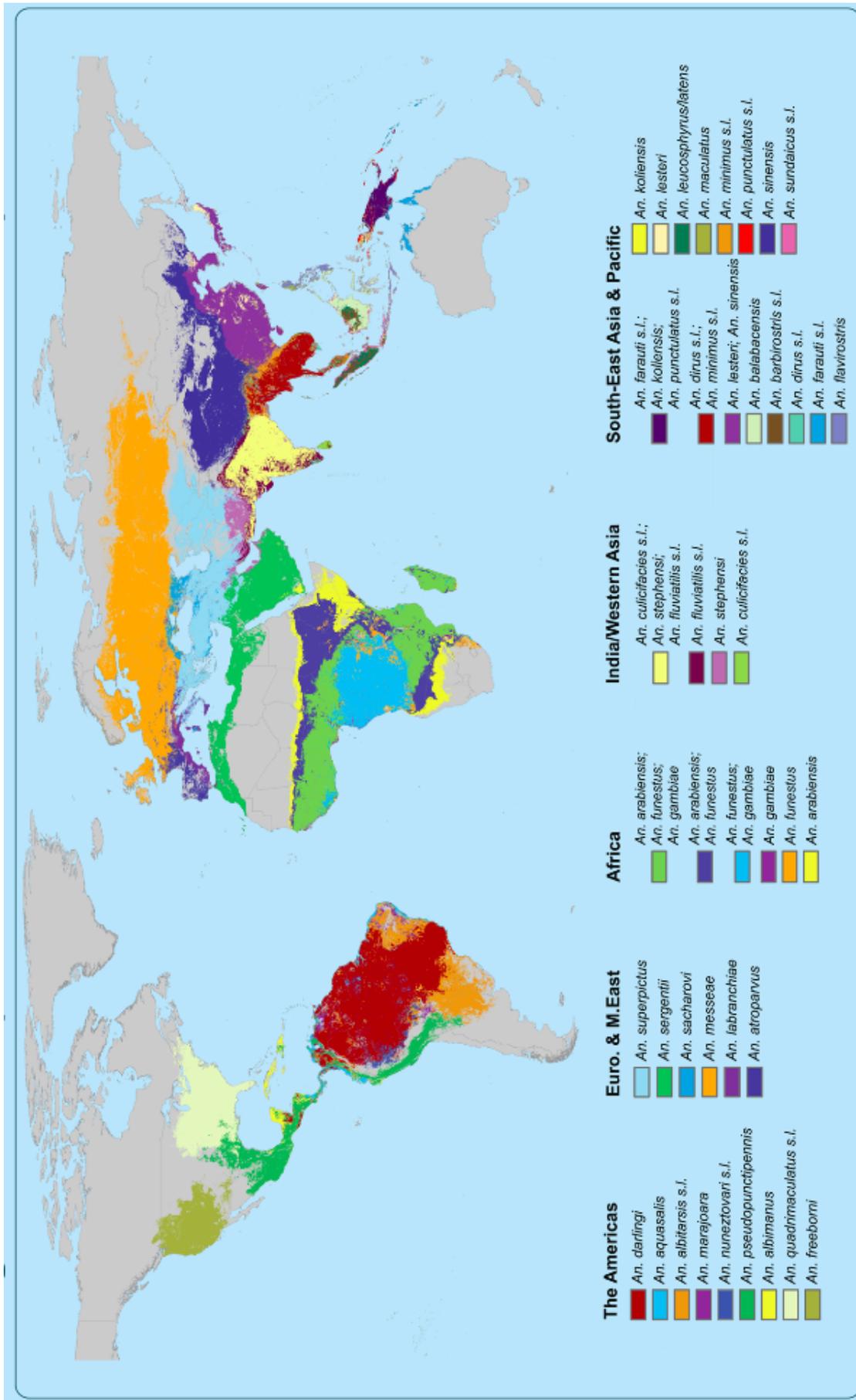


Fig. 4. Répartition géographique des vecteurs palustres d'importance majeure.

Mais ce n'est pas le seul comportement que manipule le parasite pour se répandre. En effet, il est aussi responsable de l'augmentation de la fréquence des repas sanguins du moustique (Koella, Sørensen, & Anderson, 1998).

Quant à la répartition géographique des vecteurs d'importance majeure, elle est illustrée Fig. 4. On retrouve principalement : le complexe *Anopheles gambiae* en Afrique, *Anopheles atroparvus* en Europe et Moyen-orient (même si le paludisme est éradiqué dans ces régions), *Anopheles darlingi* en Amérique, *Anopheles stephensi*, le complexes *Anopheles culicifacies* et *Anopheles farauti*, et *Anopheles lesteri* en Asie (Autino et al., 2012; Sinka et al., 2012).

2. L'AGENT PATHOGÈNE

Les *Plasmodium* sont des eucaryotes unicellulaires appartenant au phylum *Apicomplexa*, nommé ainsi à cause du complexe apical leur permettant d'envahir les cellules hôtes. Il existe plus de 150 espèces de *Plasmodium* dont cinq sont responsables de la maladie chez l'homme :

- *Plasmodium falciparum* : la plus dangereuse des 5 espèces, elle est responsable de la majorité des formes sévères et des décès liés au paludisme en Afrique subsaharienne, avec un pic de mortalité d'environ 1 million de morts sur le continent africain en 2003 (Gething et al., 2016). *P. falciparum* ne sévit pas qu'en Afrique, il est aussi retrouvé dans les régions tropicales de part le monde (Fig. 5). La sévérité liée à cette espèce est due à une propriété distinctive non partagée avec aucun autre *Plasmodium* humain; à savoir celui de la séquestration. Dans le cadre du cycle sanguin asexué de 48 heures, les formes matures changent les propriétés de surface des globules rouges infectés, ce qui les amène à adhérer aux vaisseaux sanguins (processus appelé cytoadhérence). Cela conduit à une obstruction de la micro-circulation et entraîne une dysfonction de multiple organes, mais plus généralement du cerveau dans le neuropaludisme.
- *Plasmodium vivax* : cette espèce a une répartition géographique plus étendue que *P. falciparum*, à savoir en Asie, en Amérique du sud et en Océanie (Fig.5). Cette distribution peut s'expliquer par le fait que *P. vivax* peut se développer dans le vecteur à des températures plus basses ; il peut survivre à des altitudes plus élevées et dans des climats plus frais et enfin

il peut rester en phase de dormance dans le foie sous forme d'hypnozoïtes pendant des années. Bien que des cas de paludisme à *P. vivax* sont recensés en Afrique, le risque d'infection avec cette espèce est assez faible en raison de l'absence dans de nombreuses populations africaines du gène Duffy ; un gène produisant une protéine nécessaire à *P. vivax* pour envahir les érythrocytes (Howes *et al.*, 2015; Mercereau-Puijalon & Ménard, 2010).

- *Plasmodium ovale* : cette espèce comprend 2 sous-espèces identiques morphologiquement mais différentes génétiquement : *P. o. curtisi* et *P. o. wallikeri* (parfois nommées 5^{ème} et 6^{ème} espèce capable d'infecter un hôte humain). Ces sous-espèces présentent aussi une différence clinique principale, à savoir la durée de latence entre l'infection et l'apparition des symptômes ; *P. o. wallikeri* ayant la durée de latence la plus courte. Elles sévissent principalement en Afrique intertropicale du centre et de l'Ouest, ainsi qu'en Asie (Fig. 6), où elles provoquent des fièvres bénignes avec des rechutes tardives (environ 5 ans) (Autino *et al.*, 2012; Calderaro *et al.*, 2013; Rutledge *et al.*, 2017; Sutherland, 2016; Zaw & Lin, 2016).
- *Plasmodium malariae* : on retrouve cette espèce en Afrique subsaharienne, dans une grande partie de l'Asie du Sud-Est, en Indonésie, dans de nombreuses îles du Pacifique occidental et dans les régions du bassin amazonien d'Amérique du Sud (Fig. 6) (Rutledge *et al.*, 2017; Sutherland, 2016). *P. malariae* est le parasite palustre humain le moins étudié car il provoque peu de complications (atteintes rénales : syndrome néphrotique, dommage glomérulaire...) et n'est souvent pas diagnostiqué (Rayner, 2015). Responsable de fièvres quartanes (tous les trois jours), *Plasmodium malariae* provoque des rechutes tardives (jusqu'à plus de 20 ans) mais pas à partir de parasites persistants au stade hépatique (hypnozoïtes), comme c'est le cas pour *P. vivax* et *P. ovale*, mais au stade sanguin (W. E. Collins & Jeffery, 2007).
- *Plasmodium knowlesi* : cette espèce transmise par un moustique infecté par un singe (transmission zoonotique) est surtout présente dans le sud-est de l'Asie (Fig. 7) (Shearer *et al.*, 2016). La parasitémie à *P. knowlesi* est associée aux formes sévères voire mortelles du paludisme (Millar & Cox-Singh, 2015).

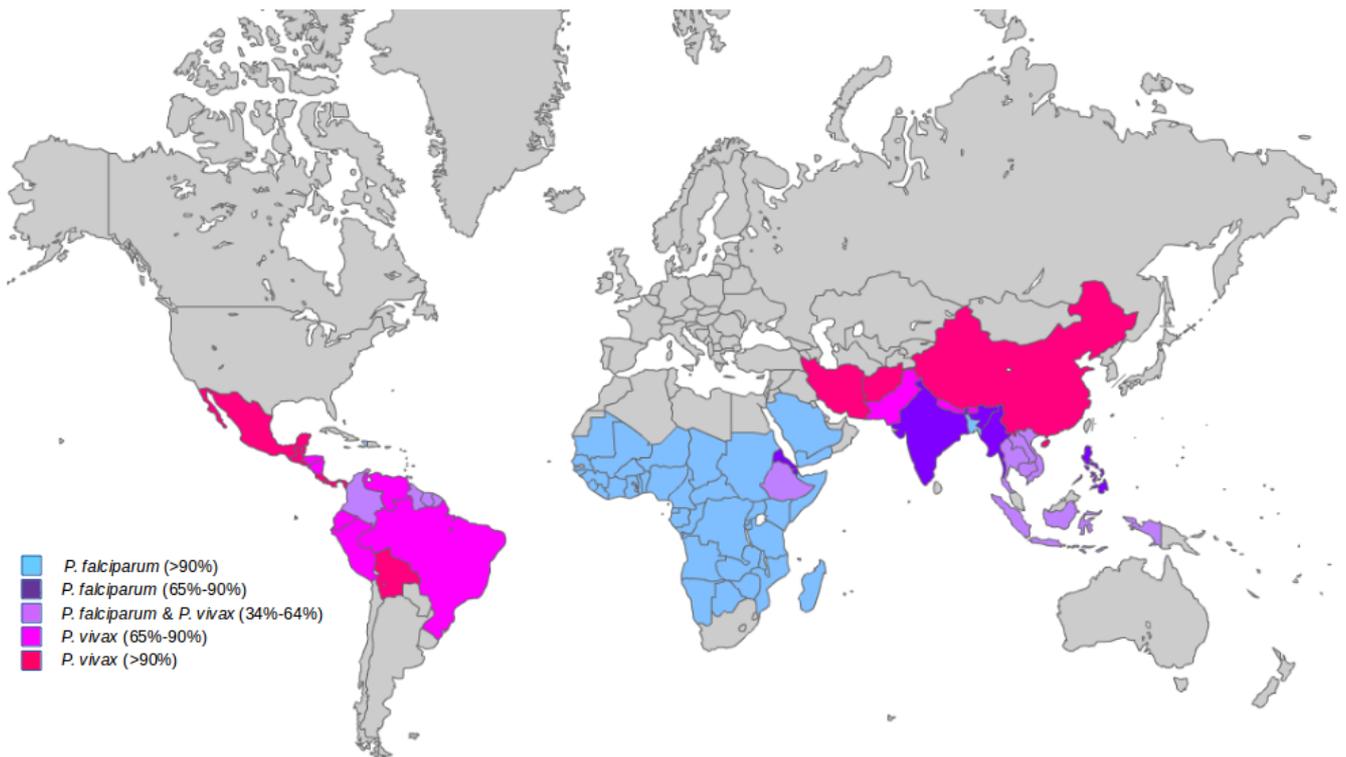


Fig. 5. Répartition géographique de *P. falciparum* et *P. vivax* en 2016. Basée sur (WHO, 2016b)

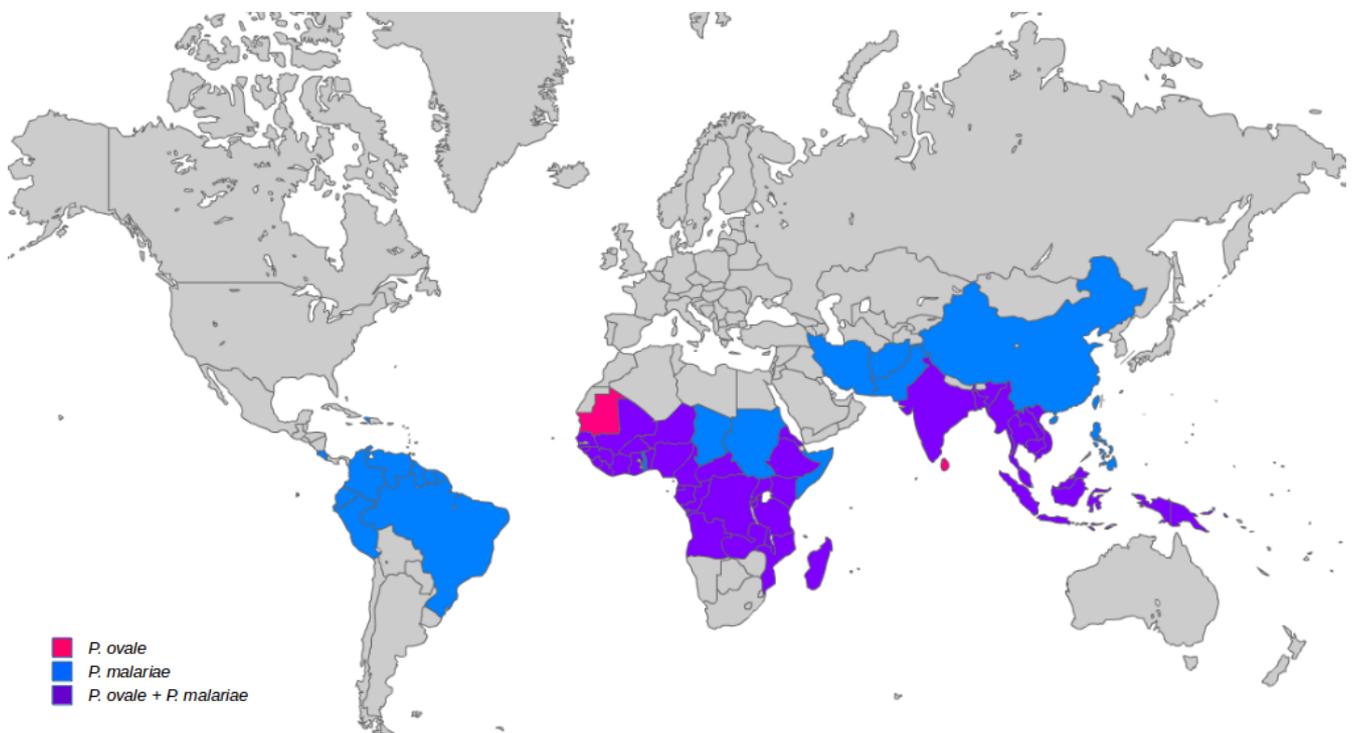


Fig. 6. Répartition géographique de *P. ovale* et *P. malariae* en 2016. Basée sur (Rutledge *et al.*, 2017)

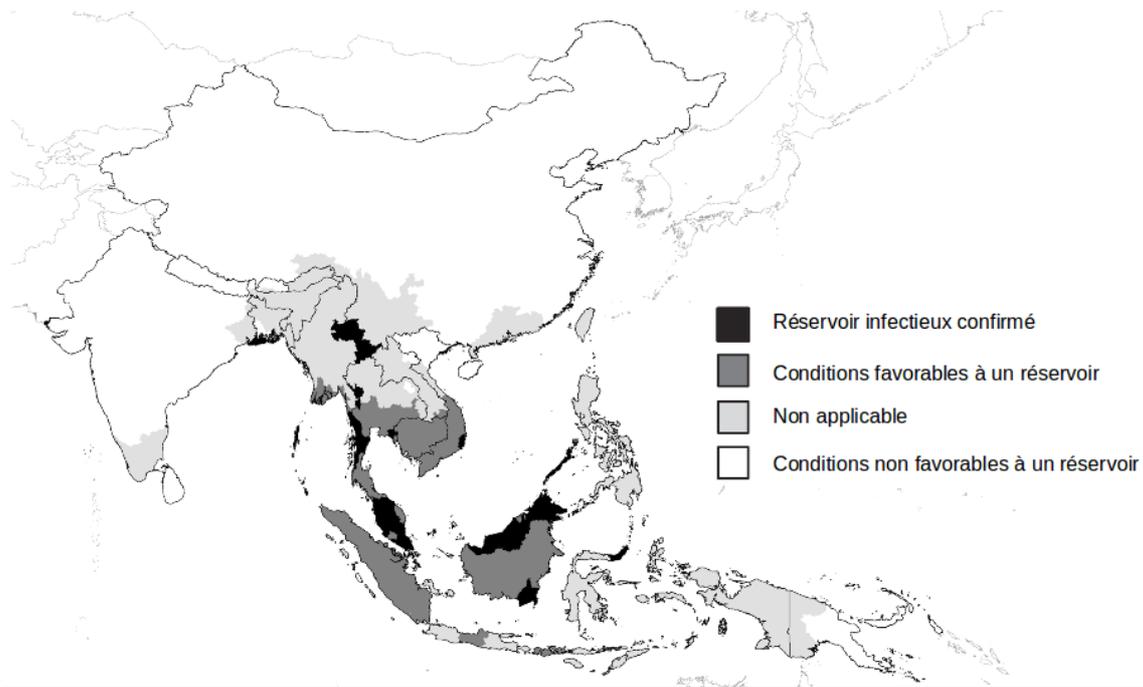


Fig. 7. Répartition géographique de *P. knowlesi* en 2014. Adaptée de (Moyes *et al.*, 2014)

P. falciparum et *P. vivax* sont les espèces les plus courantes et celles responsables de la plupart des cas de paludisme humain. En effet, selon l’OMS, en 2015, 99% des décès sont dus au paludisme à *P. falciparum*. Les infections à *P. vivax*, quant à elles, seraient à l’origine d’environ 3100 décès en 2015, dont 86 % hors Afrique. (WHO, 2016a).

3. CYCLE ET TRANSMISSION DE PLASMODIUM

Le cycle de *Plasmodium* est complexe et se déroule successivement chez deux hôtes : l’Homme ou hôte intermédiaire (phase asexuée ou schizogonique) et l’anophèle ou hôte définitif (phase sexuée, encore appelé développement sporogonique) (Fig.8).

Le cycle chez l’hôte humain, se divise aussi en deux phases de multiplication asexuée :

- la phase hépatique ou exo-érythrocytaire, qui correspond à la phase d’incubation, cliniquement asymptomatique
- la phase sanguine ou érythrocytaire, responsable des manifestations cliniques de la maladie.

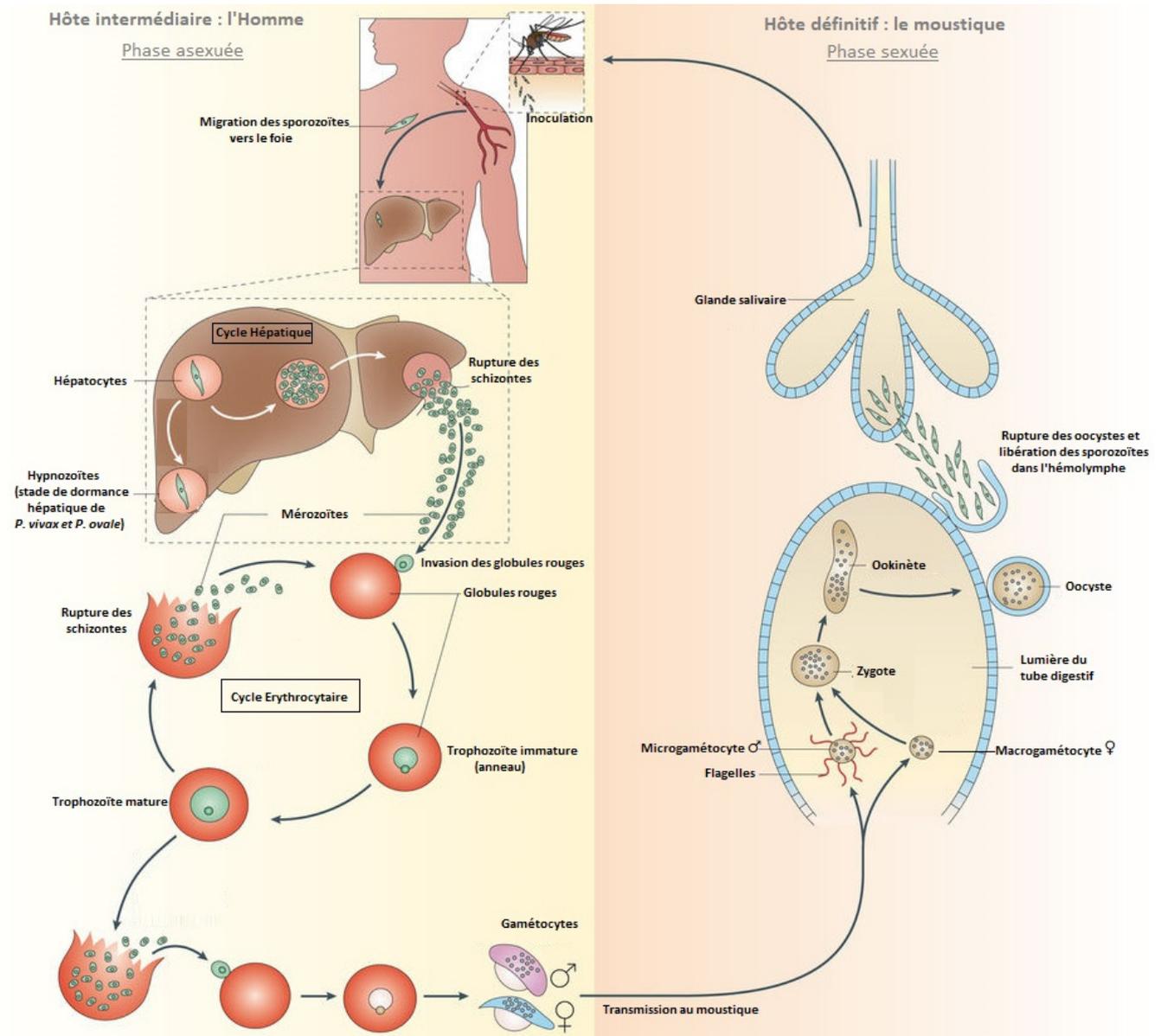


Fig. 8. Cycle simplifié du développement de *Plasmodium* chez l'hôte intermédiaire et définitif. Les parasites sous forme de sporozoïtes sont inoculés dans le tissu sous-cutané de l'hôte lors de la piqûre de la femelle Anophèle. Ils pénètrent dans le système vasculaire et migrent vers le foie où ils infectent les hépatocytes. Au sein de ces hépatocytes, ils se divisent et se différencient pour former le mérosome qui rejoint la circulation sanguine où il se rompt et libère des milliers de parasites matures sous forme de mérozoïtes. Chez certaines espèces de *Plasmodium* (*P. vivax* et *P. ovale*), certains sporozoïtes ne se divisent pas et restent quiescents sous forme d'hypozoïtes dans les hépatocytes. Les mérozoïtes libérés dans la circulation sanguine, eux, envahissent les globules rouges au sein desquels ils se multiplient. A l'issue de cette multiplication, le globule rouge est détruit et de nouveaux mérozoïtes sont libérés. Certains d'entre eux envahissent de nouveaux érythrocytes, d'autres sont reprogrammés pour subir une gamétocytogenèse. Pendant environ 15 jours, les gamétocytes sont séquestrés à l'intérieur de la moelle osseuse où ils se développent. Une fois matures, ils entrent dans la circulation périphérique pour être ingérés par un moustique lors de son repas sanguin. Chez le moustique, les gamétocytes ingérés mûrissent sous forme de microgamète mâle et macrogamète femelle. La fusion de ces gamètes forme un zygote qui se développe en ookinète mobile. Ce dernier migre à travers l'épithélium de la muqueuse intestinale et s'encyste pour devenir un oocyste où la réplication sporogonique asexuée se produit. La rupture de cet oocyste libère des sporozoïtes mobiles qui se déplacent vers les glandes salivaires où ils pourront être injectés lors d'un nouveau repas sanguin. Adaptée de (Josling & Llinás, 2015)

3.1 CYCLE SEXUÉ CHEZ L'HÔTE DÉFINITIF

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes, les formes sexuées mâles et femelles du parasite. Dans la lumière du tube digestif de l'anophèle, ces gamétocytes subissent une chute de température, un changement de pH et une exposition à l'acide xanthurénique, qui déclenchent leur maturation en gamètes (Billker *et al.*, 1998; Sologub *et al.*, 2011). Les gamétocytes mâles réalisent trois cycles de réplication de leur ADN pour former un noyau octoploïde, suivi de l'assemblage de huit flagelles pour produire des gamètes mâles sexuellement compétents, qui sont libérés dans un processus appelé exflagellation (Janse *et al.*, 1988).

Les gamètes haploïdes mâles fusionnent alors avec les gamètes haploïdes femelles pour former un zygote diploïde mobile : l'ookinète dans lequel se produit une recombinaison méiotique. Cet ookinète quitte la lumière du tube digestif pour s'implanter dans l'épithélium de la paroi stomacale et former l'oocyste. Suite à de multiples divisions mitotiques, l'oocyste finit par rompre pour libérer près de 8000 sporozoïtes haploïdes qui migrent activement à travers l'hémolymphe vers les glandes salivaires, où ils résideront jusqu'à ce que le moustique prenne un nouveau repas sanguin (Sinden, 1999).

3.2 CYCLE ASEXUÉ CHEZ L'HOMME

3.2.1 STADE HÉPATIQUE

Lors du repas sanguin de l'anophèle, une dizaine de sporozoïtes sont injectés dans le derme de l'hôte (Fig.8, Fig.9). Certains sont détruits par les macrophages à proximité, d'autres sont drainés au niveau des ganglions lymphatiques où la réponse immunitaire de l'hôte est générée ; enfin certains pénètrent dans la circulation sanguine à l'aide d'un processus de motilité par glissement (Michael F. Good & Doolan, 2007; Ménard *et al.*, 2013; Silvie, Mota, Matuschewski, & Prudêncio, 2008; Vaughan, Aly, & Kappe, 2008; Yamauchi, Coppi, Snounou, & Sinnis, 2007). Ce processus aléatoire, pouvant durer entre 1h et 3h, ne permet qu'à une petite proportion de sporozoïtes d'atteindre et de pénétrer un vaisseau sanguin. C'est la protéine TLP (*Trap-like protein*) qui joue un rôle dans cette

sortie du derme (Heintzelman, 2015). En effet, les sporozoïtes mutants dépourvus de cette protéine ont une mobilité par glissement normale mais ne peuvent pas entrer dans la circulation.

Les sporozoïtes qui entrent dans la circulation sanguine accèdent rapidement au foie par un processus connu sous le nom de traversée. Ce processus consiste en une traversée de la barrière sinusoidale hépatique qui comprend des cellules endothéliales fenestrées et des cellules de Kupffer (macrophages) (Yang & Boddey, 2017). Les protéines requises pour cette traversée sont SPECT (Ishino, Yano, Chinzei, & Yuda, 2004), SPECT2 (également connu sous le nom de protéine de type perforine 1, PLP1) (Risco-Castillo *et al.*, 2015), CelTOS (Kariu, Ishino, Yano, Chinzei, & Yuda, 2006), GEST, et une phospholipase (Bhanot, Schauer, Coppens, & Nussenzweig, 2005). La fonction de ces protéines dans la traversée cellulaire n'est pas entièrement résolue. Néanmoins, il a été montré que SPECT2 possède un domaine d'attaque membranaire de type perforine (MAC/PF), qui pourrait jouer un rôle dans la perforation des membranes cellulaires de la barrière sinusoidale. Les sporozoïtes traversent ensuite ces cellules en formant une vacuole transitoire.

Une fois la barrière sinusoidale traversée, les sporozoïtes atteignent les hépatocytes. Là, ils peuvent soit les traverser soit les envahir et se développer en formes exo-erythrocytaires (EEF). La reconnaissance et l'invasion des hépatocytes est provoquée par la liaison des sporozoïtes à des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) hautement sulfatées présentes à la surface de ces mêmes hépatocytes. Cette liaison entraîne l'activation de la protéine kinase calcium-dépendante 6 (CDPK6) du sporozoïte et le clivage de l'extrémité N-terminale de la protéine parasitaire circumsporozoïte (CSP), exposant ainsi son domaine TSR (thrombospondine de type I) (Coppi *et al.*, 2007, 2011).

D'autres protéines exprimées à la surface des hépatocytes sont impliquées dans ce processus d'invasion et de développement des EEFs. Les récepteurs CD81 et SR-B1 sont nécessaires à l'invasion et la formation d'une vacuole parasitophore au sein des hépatocytes par les sporozoïtes de *P. falciparum* (Rodrigues *et al.*, 2008). Le récepteur EphA2 est lui aussi impliqué dans la formation de la vacuole parasitophore grâce à son interaction avec les protéines parasitaires p52 et p36 (Kaushansky *et al.*, 2015).

Cette vacuole est indispensable au développement intra-hépatocytaire des EEFs qui vont entamer plusieurs cycles de réplication, aboutissant à la formation d'un mérosome contenant environ 40 000 mérozoïtes (Sturm *et al.*, 2006). Le mérosome quitte ensuite le parenchyme hépatique et entre dans la circulation sanguine. Sa rupture libère les mérozoïtes qu'il contient dans le sang.

Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, certains sporozoïtes intra-hépatiques restent en état de dormance sous forme d'hypnozoïtes et sont responsables de reviviscences tardives, plusieurs mois à plusieurs années après la piqûre d'un moustique infecté.

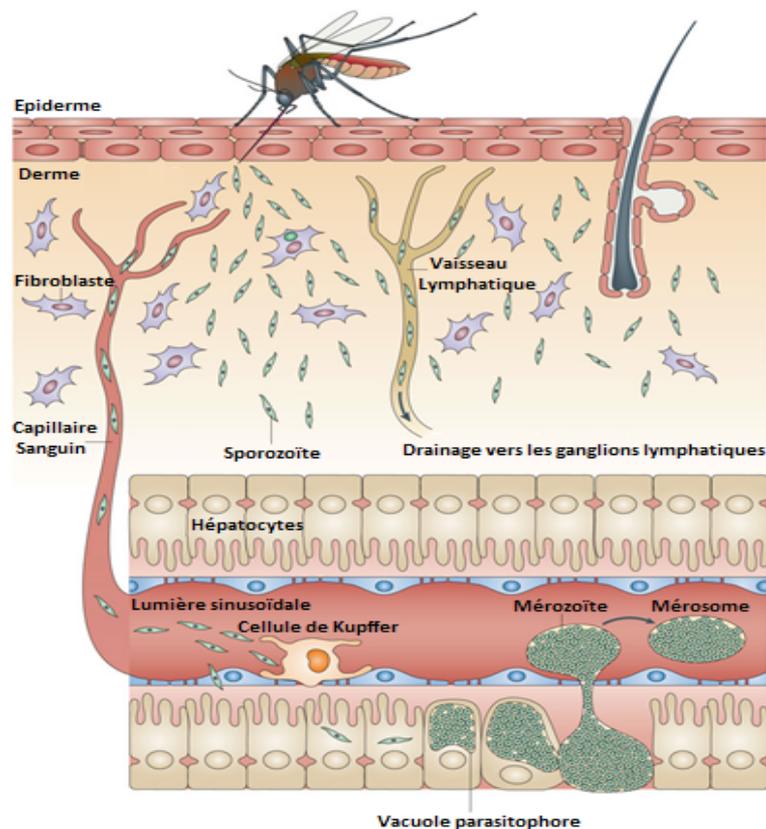


Fig. 9. Cycle exo-érythrocytaire de *Plasmodium*. Lors de son repas sanguin, le moustique inocule une dizaine de sporozoïtes dans le derme. Ces derniers sont soit détruits par les macrophages du derme, soit drainés dans les ganglions lymphatiques. Très peu atteignent les capillaires sanguins. Une fois dans la circulation, ces derniers migrent vers le foie et traversent la barrière sinusoidale par glissement. Au sein des hépatocytes, ils se différencient en formes exo-érythrocytaires et réalisent plusieurs cycles de réplication. Ceci aboutit à la formation d'un mérosome, qui entre dans la circulation sanguine, se rompt et libère plusieurs milliers de mérozoïtes. Adapté de (Ménard *et al.*, 2013)

3.2.2 STADE ÉRYTHROCYTAIRE

Une fois libérés dans la circulation hépatique, les mérozoïtes envahissent les érythrocytes dans un processus actif et rapide afin d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Ce processus est composé de 3 étapes principales (Riglar *et al.*, 2011) :

- Attachement au globule rouge et réorientation du mérozoïte : cette étape débute par une interaction initiale entre le mérozoïte et l'érythrocyte. Ce contact dépend d'un groupe de protéines parasitaires exprimées de façon constitutive, les protéines de surface des mérozoïtes (MSP). Certaines MSP telles que MSP1, MSP6, MSP7 et MSPDBL1-2 forment un complexe à la surface du mérozoïte permettant la première interaction avec les globules rouges (Kadekoppala & Holder, 2010; Lin *et al.*, 2016). Ainsi, MSP1 a été montré comme se liant à l'héparine, qui bloque l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes de *P. falciparum*, mais aussi à la glycophorine A, qui forme un complexe avec la bande 3, suggérant un rôle de cette protéine dans la reconnaissance des globules rouges (Baldwin, Li, Hanada, Liu, & Chishti, 2015; Boyle, Richards, Gilson, Chai, & Beeson, 2010). Le parasite se réoriente ensuite en présentant son extrémité apicale vers les globules rouges. Cette réorientation apicale nécessite une interaction de plus haute affinité. Ce sont les protéines d'invasion sécrétées par les micronèmes et les rhoptries à l'extrémité apicale du mérozoïte qui permettraient cette interaction (M. Koch & Baum, 2016). La sécrétion de ces protéines serait due à une augmentation de calcium à l'intérieur du mérozoïte déclenchée par un environnement pauvre en potassium, tel qu'on le trouve dans le plasma sanguin (Shailja Singh, Alam, Pal-Bhowmick, Brzostowski, & Chitnis, 2010). Parmi ces protéines d'invasion, on peut citer PfRH5 (rhoptrie), PfRipR (micronème) et PfCYRPA (micronème) qui forment un complexe protéique essentiel à l'invasion liant la basigine à la surface du globule rouge (Crosnier *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2015; Volz *et al.*, 2016; Wright *et al.*, 2014) ; EBA-175 dont la liaison avec son récepteur, la glycophorine A, déclenche la libération d'autres protéines d'invasion importante par les rhoptries dont AMA-1.

- Formation d'une jonction serrée et internalisation : cette étape consiste en un attachement irréversible du mérozoïte au globule rouge et à son internalisation. La formation de la jonction serrée implique principalement l'interaction de deux protéines parasitaires AMA-1 et RON2. RON 2 est insérée dans la membrane érythrocytaire par le mérozoïte et sert ensuite de récepteur à AMA-1 (Besteiro, Dubremetz, & Lebrun, 2011; Srinivasan *et al.*, 2011). La formation de cette jonction déclenche la libération du contenu des rhoptries, fournissant protéines et lipides nécessaires à la formation de la vacuole parasitophore et de sa membrane, ce qui permet d'établir l'espace dans lequel le mérozoïte pourra se développer suite à son internalisation (Riglar *et al.*, 2011). Cette internalisation est permise par des protéines TRAP, l'aldolase et le moteur d'actomyosine parasitaire qui propulse le mérozoïte à l'intérieur de l'érythrocyte (Diaz *et al.*, 2016).
- Fermeture de la membrane érythrocytaire et échinocytose : après la phase d'invasion active, la fusion des membranes à l'extrémité postérieure du mérozoïte se produit afin de sceller la vacuole parasitophore ainsi que l'érythrocyte. L'échinocytose suit et provoque le rétrécissement de l'érythrocyte et la formation de saillies pointues. Cela serait dû à l'influx de Ca^{2+} dans l'érythrocyte lors de l'interaction du complexe PfRh5 avec la basigine (G. E. Weiss *et al.*, 2015).

Une fois que le parasite pénètre dans le globule rouge de l'hôte, il exporte des centaines de protéines dans le cytoplasme de ce dernier et à sa surface afin de permettre l'acquisition de nutriments, l'adhésion et la séquestration cellulaire dans les tissus (Boddey & Cowman, 2013; Spillman, Beck, & Goldberg, 2015); il élimine les déchets d'hémoglobine potentiellement toxiques en les cristallisant en hémozoïne biologiquement inerte (Francis, Sullivan, & Goldberg, 1997) et il entreprend sa différenciation au sein de la vacuole parasitophore. Au stade de trophozoïte, une intense phase répllicative commence pour donner naissance au schizonte contenant entre 8 et 32 mérozoïtes qui sont alors expulsés afin d'envahir de nouveaux globules rouges.

Le processus d'expulsion des mérozoïtes est étroitement coordonné et régulé. Il implique plusieurs protéines kinases, dont les protéines kinases PfCDPK5 et PfPKG (C. R. Collins *et al.*, 2013; Dvorin *et al.*, 2010). MSP1 joue également un

rôle dans ce processus grâce à son activation par la subtilisine 1 à la surface du mérozoïte lui permettant de lier la spectrine (protéine de membrane érythrocytaire) (Das *et al.*, 2015).

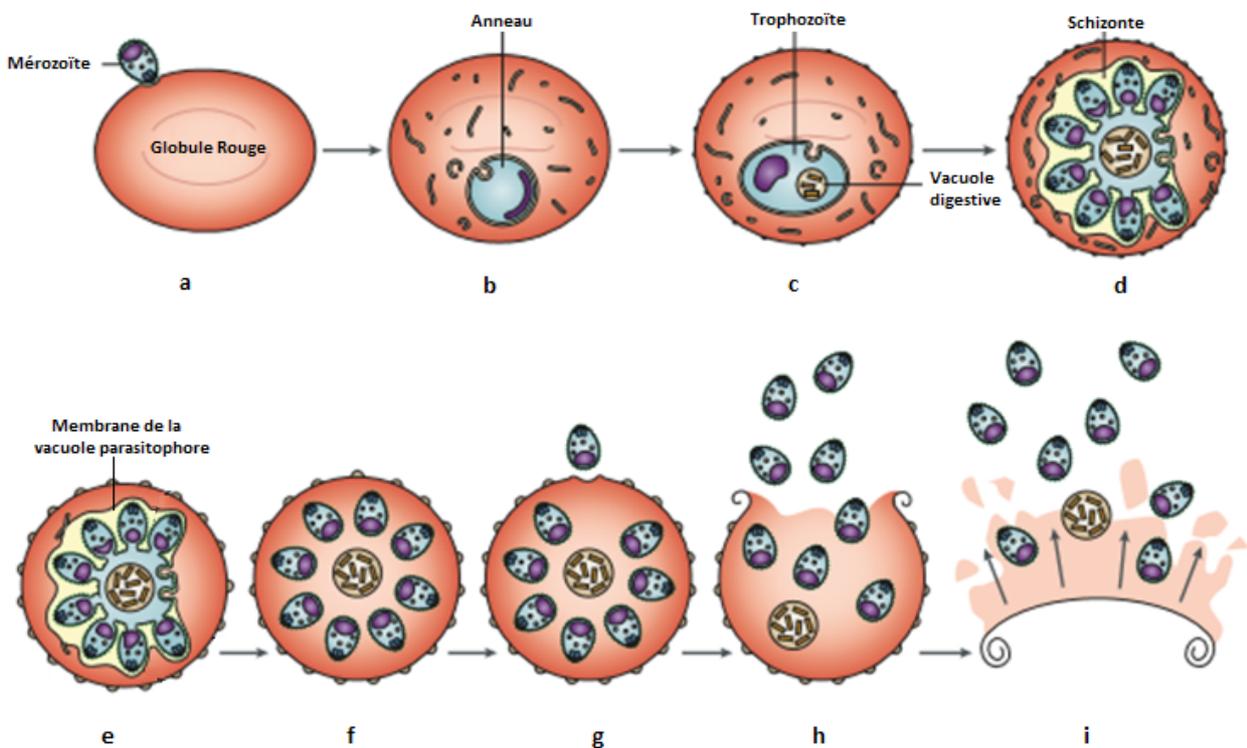


Fig. 10. Cycle érythrocytaire asexué de *Plasmodium*. **a.** Invasion du globule rouge. **b.** Différenciation au sein de la vacuole parasitophore en anneau, **c.** puis en trophozoïte, stade à partir duquel une intense phase répliquative commence. **d.** Il donne alors naissance au schizonte, celui-ci après segmentation montre une forme caractéristique de rosace. **e.** Gonflement osmotique des globules rouges. **f.** Rupture de la membrane de la vacuole parasitophore. **g.** Ouverture osmotique de pores. **h.** Déroulement de la membrane érythrocytaire. **i.** Éjection rapide de 8 à 32 mérozoïtes. Adapté de (De Niz *et al.*, 2017)

3.3 TRANSMISSION DE L'HÔTE AU MOUSTIQUE

La transmission du paludisme de l'homme aux moustiques dépend du développement des formes sexuées. Au cours du cycle érythrocytaire, une proportion des mérozoïtes libérés sont reprogrammés pour s'engager dans la gamétocytogenèse. L'ensemble des événements moléculaires responsables de cette reprogrammation ne sont pas encore identifiés. Cependant, il semblerait que le moment de transition vers ce développement sexuel se produise avant le début du cycle érythrocytaire précédant la libération des mérozoïtes. En effet, les mérozoïtes filles d'un même schizonte s'engagent soit dans la gamétocytogenèse soit dans l'invasion de nouveaux érythrocytes. Les stimuli tels

qu'une parasitémie élevée ou l'exposition à des médicaments comme la chloroquine, sont associés à une augmentation de cette reprogrammation sexuelle, ce qui indique que les parasites peuvent sentir leur environnement (Josling & Llinás, 2015). La régulation épigénétique est elle aussi essentielle au contrôle de la différenciation sexuelle, et le facteur de transcription AP2-G est un régulateur maître de la gamétocytogenèse (Kafsack *et al.*, 2014). La maturation des gamétocytes de *P. falciparum* est plus longue en comparaison des autres espèces. Une fois que l'engagement dans cette voie est pris, il faut une quinzaine de jours pour que les gamétocytes matures se développent. Pendant leur développement, ils restent séquestrés dans la moelle osseuse afin d'éviter la clairance splénique (Joice *et al.*, 2014). Une fois matures, ils entrent dans la circulation périphérique pour infecter le moustique lors de son repas sanguin.

C. LES MANIFESTATIONS CLINIQUES

Une fois infecté par *Plasmodium*, la réponse de l'hôte peut être extrêmement variable allant de l'infection asymptomatique, aux accès simples voire sévères pouvant aboutir à la mort de l'individu. La sévérité de ces manifestations cliniques est déterminée par des interactions complexes entre l'hôte, le parasite et les facteurs environnementaux (Fig. 14). Peu d'études impliquant d'autres espèces que *P. falciparum* sont disponibles pour certaines manifestations cliniques, notamment le paludisme asymptomatique. C'est pourquoi dans cette partie et celles qui suivront, l'intérêt sera porté principalement sur les infections à *P. falciparum*.

1. PALUDISME ASYMPTOMATIQUE

Les formes asymptomatiques d'infection se produisent sans symptômes manifestes, de fait, elles représentent un vaste réservoir caché d'infection active qui permet la persistance du parasite et sa propagation éventuelle à d'autres hôtes humains.

On comprend mal pourquoi certaines personnes développent des manifestations cliniques pendant l'infection palustre alors que d'autres restent asymptomatiques. L'exposition (Daubersies *et al.*, 1996; Day & Marsh, 1991;

[Trape et al., 1994](#)), l'état de santé général et la condition physiologique de l'hôte, en particulier les variations de l'immunité, ainsi que la prédisposition génétique de l'hôte, les facteurs parasitaires impliqués dans la virulence de l'infection ou encore l'environnement peuvent influencer la progression de l'infection palustre vers une forme asymptomatique.

Les infections paludéennes asymptomatiques sont fréquentes chez les humains vivant dans des régions endémiques, y compris dans les milieux à faible transmission comme au Pérou, au Brésil, en Colombie ou encore dans les Îles Salomon ([Fabiana P. Alves et al., 2002](#); [Fabiana Piovesan Alves et al., 2005](#); [Branch et al., 2005](#); [Cerutti et al., 2007](#); [Cucunubá et al., 2008](#); [Fugikaha et al., 2007](#); [Harris et al., 2010](#); [Imwong et al., 2015](#); [Roper et al., 2000](#); [Roshanravan et al., 2003](#)), En effet, dans ces régions, les formes asymptomatiques ont des prévalences quatre à cinq fois plus élevées que les infections symptomatiques.

Cependant, on sait peu de choses sur les conséquences silencieuses ou à long terme des infections asymptomatiques sur la santé. Une étude conduite dans la région de Sumba (Indonésie), a montré que comparativement aux individus non infectés, les personnes atteintes d'infections asymptomatiques présentent des niveaux plus élevés de marqueurs d'inflammation, du facteur de von Willebrand et du facteur plaquettaire 4 mais aussi une numération plaquettaire et un taux d'hémoglobine plus faibles ([de Mast et al., 2015](#)). L'infection palustre asymptomatique a également été associée à l'anémie chez les femmes enceintes ([Matangila et al., 2014](#)) et les enfants ([Maketa et al., 2015](#)), ainsi qu' à la malnutrition chronique ([Maketa et al., 2015](#)) et aux troubles cognitifs chez les enfants ([Nankabirwa et al., 2013](#)).

Mais comment définir le paludisme asymptomatique ?

Il n'existe pas de définition standard de parasitémie asymptomatique, et les différentes études menées à ce jour ont utilisé une gamme de définitions et de critères diagnostiques pour l'identifier. La plupart des définitions impliquent la détection de parasites asexués ou sexuels, une température axillaire inférieure à 37,5 °C et l'absence de tout symptôme clinique lié au paludisme pendant une période de temps spécifiée ([de Mast et al., 2010](#); [Duarte et al., 2007](#); [Leoratti et al., 2008](#); [Males, Gaye, & Garcia, 2008](#)). Alors qu'elle n'est pas toujours explicite,

la parasitémie asymptomatique fait référence aux infections des stades sanguins et n'inclut pas les stades hépatiques dormants.

Certaines études incluent d'autres critères, comme la quantification de la parasitémie. Cette quantification, plutôt que de noter la présence ou l'absence de parasites, peut également être un facteur important à prendre en considération lors du diagnostic du paludisme asymptomatique. Cependant, aucun seuil parasitaire standard permettant de classer une infection comme asymptomatique n'a encore été défini, et les différentes études utilisent des seuils de densité parasitaire différents (dalla Martha, Tada, Ferreira, da Silva, & Wunderlich, 2007; Rottmann et al., 2006; Touré, Bisseye, & Mavoungou, 2006). D'autres études, encore, ont utilisé ces seuils (variables) de densité parasitaire pour définir les cas de paludisme symptomatique, c'est-à-dire que seuls les cas de fièvre dont la densité parasitaire dépassait un seuil prédéterminé ont été considérés comme des cas de paludisme symptomatique (T. Smith, Schellenberg, & Hayes, 1994). Il en résulte une classification de facto des infections fébriles avec parasitémie de faible densité comme asymptomatiques, leur fièvre n'étant pas statistiquement attribuée à l'infection palustre.

Un autre critère variable entre les différentes études est le suivi longitudinal. La durée du temps nécessaire pour définir une infection comme asymptomatique, avant et après le diagnostic, varie d'une étude à l'autre; plusieurs ont défini l'infection asymptomatique comme étant l'absence de fièvre mesurée au moment de l'enquête, tandis que d'autres ont nécessité jusqu'à 60 jours de suivi sans symptômes cliniques pour la définir comme telle (Fabiana Piovesan Alves et al., 2005). Lorsque les périodes de suivi ne sont pas surveillées pour déceler l'apparition de symptômes, on peut craindre que la parasitémie détectée pendant la période d'incubation du paludisme ne soit classée à tort comme une infection asymptomatique (Fabiana P. Alves et al., 2002; Coura, Suárez-Mutis, & Ladeia-Andrade, 2006; Cucunubá et al., 2008; dalla Martha et al., 2007; de Mast et al., 2010; Duarte et al., 2007; Harris et al., 2010; Leoratti et al., 2008; Males et al., 2008; Rojo-Marcos et al., 2011; Rottmann et al., 2006; Suárez-Mutis et al., 2007; Touré et al., 2006; Vinetz, Li, McCutchan, & Kaslow, 1998), mais étant donné la courte période entre l'achèvement de la période pré-patente et la fin de la période d'incubation (~1 jour pour *P. falciparum* et 4 jours pour *P. vivax*), il s'agit probablement d'un événement peu fréquent. Dans certaines études, les cas ont

été exclus s'ils ont signalé une utilisation antérieure de médicaments antipaludiques pour éviter les infections en cours d'élimination. Laishram *et al.* fournissent une liste des critères diagnostiques qui ont été utilisés dans diverses études pour définir les cas de paludisme asymptomatique (Tableau 1)([Laishram et al., 2012](#)).

Enfin, il peut arriver que ces formes asymptomatiques ne soient pas décelées car non repérées par les méthodes classiques de détection, à savoir la microscopie. Bien que l'utilisation de la PCR spécifique aux espèces n'est pas toujours possible sur le terrain, c'est un outil puissant pour détecter le paludisme asymptomatique au sein d'une population. Par exemple, Bottius *et al.* ([Bottius et al., 1996](#); [Dal-Bianco et al., 2007](#); [de Andrade et al., 1995](#); [Eke & Chigbu, 2006](#)) ont constaté que jusqu'à 2/3 des cas de parasitémie non détectée par microscopie chez les patients, ont pu l'être par PCR diagnostique, ce qui indique que presque toute la population était atteinte chroniquement de paludisme asymptomatique.

2. ACCÈS PALUSTRE SIMPLE

Les symptômes cliniques les plus fréquents d'un accès palustre non compliqué à *P. falciparum* sont : une fièvre élevée accompagnée d'une fatigue intense, d'une sensation de malaise général avec frissons, douleurs musculo-squelettiques, céphalées, troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales) suivis de sueurs ([Grobusch & Kremsner, 2005](#)).

La fièvre est souvent irrégulière au début d'un épisode palustre simple, jusqu'à ce que s'instaure la synchronisation des schizontes (qui rompent les érythrocytes infectés lors d'une infection synchrone au stade asexué du sang) où la périodicité des accès fébriles s'établit en fonction des espèces de parasites : toutes les 24h (fièvre quotidienne) pour *P. knowlesi* ([Cox-Singh et al., 2008](#)), toutes les 48 heures (fièvre tierce) pour *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale*, et toutes les 72 heures (fièvre quarte) pour *P. malariae*.

En effet, les accès fébriles palustres sont causés par les parasites du stade sanguin. La lyse des érythrocytes infectés libère dans la circulation sanguine non seulement des mérozoïtes, mais aussi des exoantigènes parasitaires comme l'hémozoïne et le glycosylphosphatidylinositol (GPI).

Références, année et pays d'étude	Critères utilisés pour identifier le paludisme asymptomatique	Sujets d'étude, taille de l'échantillon	Durée et protocole de suivi
AFRIQUE			
Abdel-Latif et al., 2003, Gabon	Parasitémie à <i>P. falciparum</i> sans aucun symptôme palustre lors du prélèvement ni pendant 5j (au moins) durant le suivi.	Enfants 6 mois à 10 ans, N=60	Détection de parasite par goutte épaisse 1 fois/j pendant 7j ; puis, 1 fois/2j jusqu' à apparition de symptômes cliniques
Farnert A et al., 2009, Kenya	Parasitémie à <i>P. falciparum</i> <10000 parasites/ μ L sans aucun symptôme palustre. Les personnes présentant de la fièvre (avec ou sans parasitémie) au moment de l'enquête ou dans la semaine suivant l'enquête, ainsi que les enfants avec une parasitémie > 10 000 parasites/ μ L ont été exclus.	Enfants 0 à 10 ans, N=1285	Une semaine.
Males S et al., 2008, Sénégal	Parasitémie à <i>P. falciparum</i> révélée par frottis sanguin, sans aucun signe clinique de paludisme tel que fièvre ou antécédents de fièvre.	Individus 2 à 18 ans, N=1356	Durée spécifique non mentionnée.
Wilson NO et al., 2010, Ghana	Femmes ne présentant aucun symptôme clinique du paludisme au 3 ^{ème} trimestre de leur grossesse, présentant une parasitémie à <i>P. falciparum</i> détectée par ELISA.	Femmes enceintes 15 à 48 ans, N=40	Pas de suivi.
AMÉRIQUE DU SUD			
Leoratti FM et al., 2008, Amazonie brésilienne	Individus infectés par <i>P. falciparum</i> (parasitémie détectée par goutte épaisse ou PCR) sans symptômes pendant 60 jours consécutifs.	Individus moyenne 35.5 ans, N=304	60 jours consécutifs
Cucunuba ZM et al., 2008, Colombie	Individus présentant une parasitémie à <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> ou <i>P. malariae</i> ou mixtes détectée par microscopie ou PCR, ayant persisté pendant au moins deux semaines sans provoquer de symptômes.	Individus 2 à 78 ans, N=21	Suivi aux jours 14 et 28.
ASIE			
Boutis CS et al., 2003, Papouasie	Pas d'antécédents de fièvre ou de traitement antipaludique au cours de la semaine précédant le prélèvement, aucun signe clinique de paludisme ou d'autres infections, pas de diarrhée ni de grossesse en cours, et présence de parasitémie à <i>P. falciparum</i> et <i>P. vivax</i> .	Adultes ≥ 16 ans, N=105	Surveillance nocturne au centre de santé local. Entrevue en soirée durant laquelle les détails cliniques ont été revus et où la mesure de la température axillaire a été répétée. Une troisième température axillaire a été enregistrée le lendemain matin.
de Mast Q et al., 2010, Indonésie	Présence de parasitémie à <i>P. falciparum</i> ou <i>P. vivax</i> en l'absence de fièvre (température $\leq 37,9^{\circ}\text{C}$) et de signes cliniques évoquant le paludisme ou une autre maladie infectieuse.	Enfants 5 à 15 ans, N=381	Pas de suivi.

Tableau 1. Exemples de critères utilisés pour définir les patients atteints de paludisme asymptomatiques. Basé sur *Laisram et al., 2012*

Ces exoantigènes sont des motifs moléculaires associés au pathogène (PAMP) dont il a été démontré qu'ils sont reconnus par les récepteurs de type Toll-like (TLR), exprimés par des cellules du système immunitaire inné (macrophages et cellules dendritiques), dont l'activation stimule une production de cytokines et médiateurs pro-inflammatoires pyrogénique [14]. Ainsi, la reconnaissance du GPI parasite par le récepteur TLR2 et celle de l'ADN plasmodial recouvert d'hémozoïne par le TLR9 entraîne une production de TNF- α , d'IL-1 β , et d'IL-6 par les macrophages. Ces cytokines pyrogènes traversent la circulation sanguine pour atteindre les régions thermorégulatrices de l'hypothalamus où elles induisent la production de prostaglandine E2 (PGE2) par les cellules endothéliales et périvasculaires associées à la barrière hémato-encéphalique. La PGE2 se fixe ensuite aux récepteurs EP-3 des cellules nerveuses hypothalamiques conduisant à une augmentation de la température (Fig. 12) (Oakley, Gerald, McCutchan, Aravind, & Kumar, 2011).

Au fur et à mesure que la densité parasite augmente, la quantité d'exoantigènes parasites et de cytokines pro-inflammatoire augmente, ainsi que la température corporelle et le risque de fièvre. Ainsi, une densité parasite minimale requise pour déclencher la fièvre palustre définit un seuil pyrogénique (Fig. 11). Certaines études proposent que la parasitémie permettrait de distinguer les accès fébriles palustres des accès fébriles non palustre, à condition de tenir compte de l'âge et de l'intensité de transmission. Une étude longitudinale conduite à Dielmo a démontré que le seuil pyrogénique de la parasitémie varie avec l'âge chez les individus continuellement exposés au paludisme (Rogier, Commenges, & Trape, 1996). Ce seuil est élevé chez les enfants et diminue chez les adultes. Cette étude avance même que lorsque la parasitémie d'un individu donné dépasse le seuil pyrogénique correspondant à son âge, le risque de fièvre est multiplié par 44. Il a été démontré que le seuil pyrogénique des infections à *P. falciparum* chez les individus non immuns couvre un large éventail de densités parasites allant de 10 à 200 000 parasites/ μ l de sang, variant en fonction de l'intensité de la transmission, de l'âge ou de l'ethnie hôte (Michelle L. Gatton & Cheng, 2002). Dans les zones à transmission élevée, la maladie clinique n'est pas souvent associée à une parasitémie de *P. falciparum* inférieure à 10 000 parasites/ μ l de sang. Ainsi, on observe une relation entre l'augmentation de la densité parasite de *P. falciparum* et la fièvre chez les

enfants dans les zones de transmission élevée (T. Smith, Killeen, Lengeler, & Tanner, 2004). Cependant, cela n'a pas été démontré dans d'autres régions à saisonnalité intense ou dans des contextes de faible transmission (Boisier, Jambou, Raharimalala, & Roux, 2002), remettant en question la fiabilité d'un seuil parasitémique pour distinguer les accès palustres d'autres causes de fièvre dans ces régions. En outre, des différences significatives ont été observées entre les seuils pyrogéniques pour différentes souches de *P. falciparum* (Michelle L. Gatton & Cheng, 2002), ce qui suggère que certaines souches peuvent induire une réponse fébrile chez l'hôte à des densités parasitaires plus faibles que d'autres souches. Ces différences peuvent s'expliquer par les variations de la virulence des souches dans l'induction d'une réponse inflammatoire.

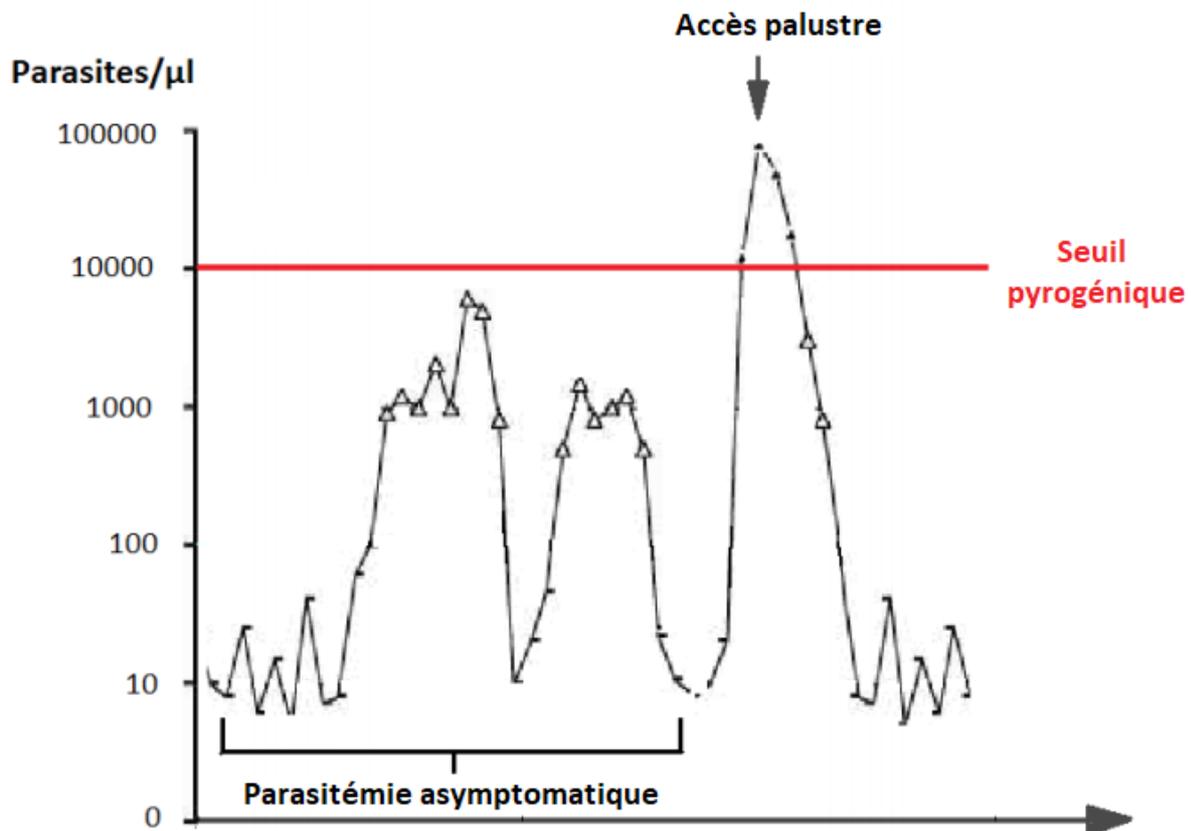


Fig. 11. Lien entre la parasitémie et les accès palustres. La parasitémie est impliquée dans l'apparition des symptômes. La densité parasitaire au-dessus de laquelle un accès fébrile palustre est induit, définit le seuil pyrogénique. Ce seuil clinique n'est pas fixe, il dépend de l'âge, de l'état d'immunité de l'hôte ainsi que du niveau de transmission.

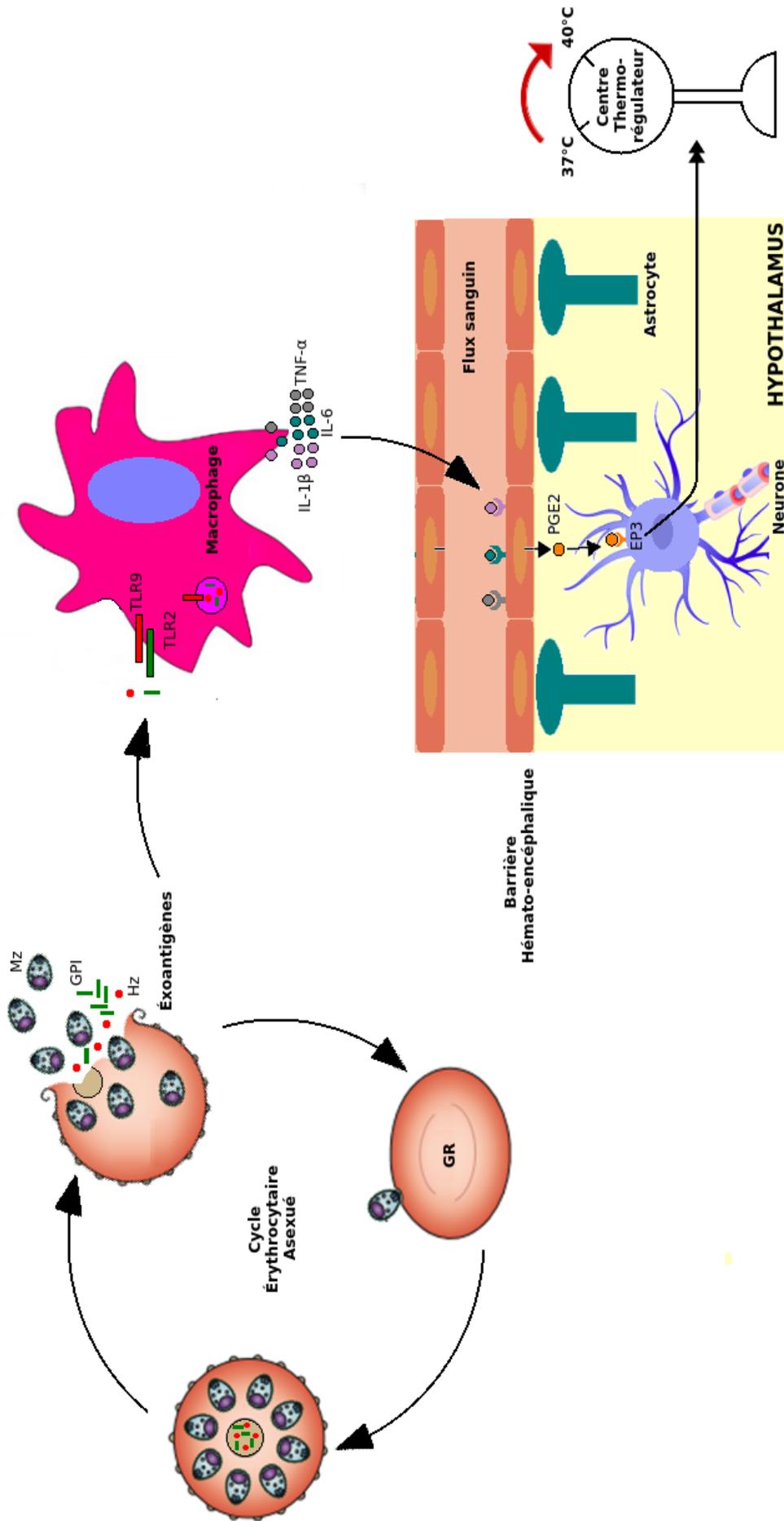


Fig. 12. Mécanismes d'induction de la fièvre palustre. Au cours du stade sanguin de l'infection palustre, la lyse des érythrocytes infectés libère des exo-antigènes parasitaires (GPI, hémozoïne, ADN/ARN plasmodial...) qui sont reconnues par les récepteurs de type Toll-like (TLR) à la surface des phagocytes et autres cellules immunitaires innées. Ces cellules produisent ensuite des médiateurs et cytokines pro-inflammatoires pyrogéniques (TNF- α , IL-1 β , et IL-6) qui agissent sur les cellules endothéliales hypothalamiques et induisent la production de PGE2. Le PGE2 se fixe ensuite aux récepteurs EP-3 des cellules nerveuses hypothalamiques entraînant ainsi l'augmentation de la température corporelle. Abréviations: Hz, hémozoïne; GPI, glycosylphosphatidylinositol; Mz, Mérozoïte; TLR, Toll-like receptor. Basé sur ([Oakley et al., 2011](#))

3. PALUDISME SÉVÈRE

Chez certains individus, l'infection initiale évolue vers un paludisme sévère pouvant entraîner la mort. La plupart des formes graves sont dues à *P. falciparum*, et dans une moindre mesure à *P. vivax* (Anstey, Douglas, Poespoprodjo, & Price, 2012; Barber et al., 2013; Bassat & Alonso, 2011) et *P. knowlesi* (Cox-Singh et al., 2008, 2010; Fatih et al., 2012; Rajahram et al., 2012). En Afrique, la plupart des décès dus au paludisme sévère surviennent chez les enfants et se présente sous la forme de trois manifestations cliniques majeures pouvant survenir séparément ou en combinaison : l'anémie sévère, le paludisme cérébral et la détresse respiratoire (Marsh et al., 1995; WHO, 2000). D'autres symptômes âge-dépendants détaillés dans le tableau 2 peuvent néanmoins accompagner ces manifestations (WHO, 2014).

		Enfants	Adultes
Manifestations Cliniques	Altération de la conscience	+++	++
	Détresse respiratoire	+++	++
	Convulsions	+++	+
	Prostration	+++	+++
	État de choc	+	+
	(Edème pulmonaire	+/-	+
	Trouble de la coagulation	+/-	+
	Ictère	+	+++
Indicateurs biologiques	Anémie sévère	+++	+
	Hypoglycémie	+++	++
	Acidose	+++	++
	Hyperlactatémie	+++	++
	Atteinte rénale	+	+++
	Hyperparasitémie	++	+

Tableau 2. Manifestations cliniques des accès sévères à *Plasmodium falciparum* chez les adultes et les enfants et les fréquences associées

3.1 NEUROPALUDISME

Deux mécanismes majeurs, interdépendants, contribuent à la pathogenèse du neuropaludisme (Storm & Craig, 2014; Wassmer et al., 2015) :

- l'obstruction des micro-vaisseaux cérébraux suite à la séquestration des érythrocytes infectés

- l'induction d'une réponse pro-inflammatoire exacerbée et l'activation des cellules endothéliales

L'occlusion vasculaire conduisant au paludisme cérébral est basé sur la capacité des érythrocytes infectés à être séquestré dans les micro-vaisseaux cérébraux. Cette séquestration peut se décomposer en plusieurs phénomènes (Fig. 13) : la cytoadhérence, la formation de rosettes (interaction de globules rouges infectés et non-infectés) et la formation d'agrégats plaquettaires (interaction entre globules rouges infectés d'une part et avec l'endothélium d'autre part, par l'intermédiaire des plaquettes) (G. E. R. Grau & Craig, 2012).

Lors de l'infection par *P. falciparum*, le globule rouge est remodelé par le parasite provoquant la formation de petites protubérances membranaires appelées « knobs ». Ces dernières ont été identifiées comme étant le site de contact entre les cellules endothéliales et les protéines palustres exprimées à la surface des globules rouges infectés, notamment PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1) (Kilejian, 1979).

La cytoadhérence des globules rouges infectés implique la liaison de cette protéine parasitaire aux molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales, telles qu'ICAM-1, VCAM-1, CD36 ou encore EPCR (Encadré 1) (Q. Chen, Schlichtherle, & Wahlgren, 2000; Lennartz et al., 2017; Pasloske & Howard, 1994; Rowe, Claessens, Corrigan, & Arman, 2009; J. D. Smith, Rowe, Higgins, & Lavstsen, 2013). Cette capacité à lier différents récepteurs hôtes est due au caractère hautement polymorphe des protéines PfEMP1.

La formation de rosettes est liée à l'interaction des globules rouges infectées via PfEMP1 aux globules rouges non-infectées via les héparanes sulfates et le récepteur CR1, mais aussi à la liaison des protéines parasitaires STEVOR et RIFIN (à la surface des globules rouges infectés) à la glycopherine C et l'antigène du groupe sanguin A respectivement (à la surface des globules rouges sains) (Yam, Niang, Madnani, & Preiser, 2017).

À l'origine des phénomènes d'agrégation plaquettaires, les globules rouges infectés se fixent via PfEMP1 au CD36 exprimé à la surface des plaquettes ; ces dernières son recrutées via le facteur de von Willebrand sécrété par les cellules endothéliales activées (O'Sullivan, Preston, O'Regan, & O'Donnell, 2016).

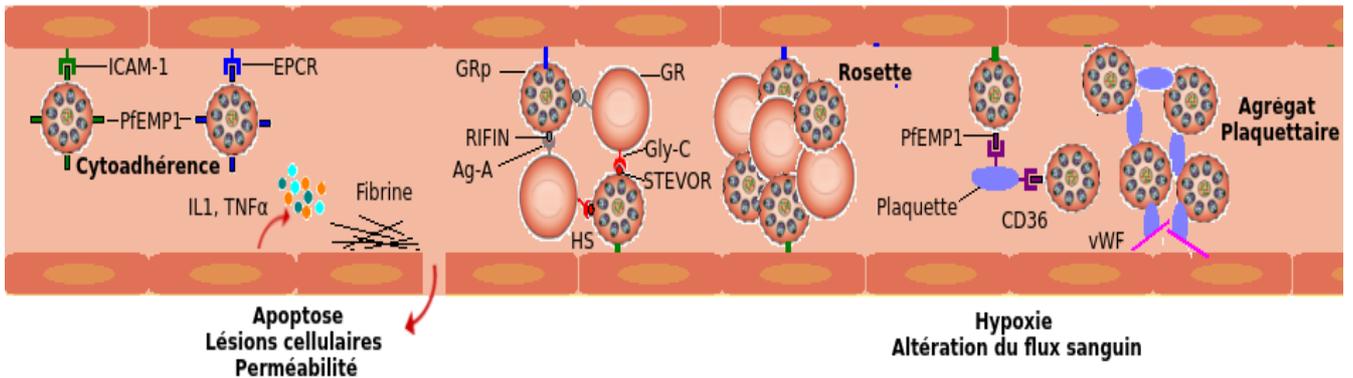


Fig. 13. Mécanismes liés à la cytoadhérence à l'origine du paludisme sévère. Suite à son invasion par *Plasmodium*, le globule rouge infecté est remodelé par le parasite qui exprime alors à sa surface des antigènes parasitaires d'une grande variabilité. Ces antigènes sont responsables de la séquestration des globules rouges infectés dans les capillaires des organes vitaux. Parmi eux, PfEMP1, dont les nombreux variants sont capables de reconnaître différents récepteurs à la surface des cellules endothéliales, bloque le site de liaison de la protéine C dans le récepteur EPCR, empêchant ainsi son activation. L'absence de protéine C activée entraîne une augmentation de la formation de thrombine, ce qui déclenche des signaux pro-inflammatoires et des signaux de rupture de la barrière endothéliale, à l'origine des formes sévères. Ce phénomène est amplifié par une activation des cellules endothéliales par les cytokines pro-inflammatoires provenant des macrophages activés par les exoantigènes parasitaires libérés lors de la rupture des schizontes érythrocytaires. Ces antigènes variables de surface sont aussi à l'origine de la formation de rosettes via l'interaction des protéines parasitaires STEVOR et RIFIN avec la glycophorine C et l'antigène du groupe A à la surface du globule rouge sain (PfEMP interagit avec CR1) et d'agrégats plaquettaires via l'interaction de PfEMP1 avec le CD36 à la surface des plaquettes. Séquestration, rosette et agrégats sont à l'origine d'une altération du flux sanguin et d'une hypoxie tissulaire. Abréviations: Ag-A, antigène du groupe A; Gly-C, glycophorine C; GR, globule rouge; GRp, globule rouge parasité; HS, héparane sulfate; vWF, facteur de von Willebrand.

Séquestration, formation de rosettes et d'agrégats plaquettaires sont des mécanismes mis en place par le parasite afin d'échapper à la clairance splénique.

L'autre mécanisme à l'origine du neuropaludisme est l'induction d'une réponse pro-inflammatoire exacerbée et l'activation des cellules endothéliales.

En effet, lors de la rupture des érythrocytes infectés de la phase sanguine, des exoantigènes parasitaires (GPI, ADN/ARN, hémozoïne...) sont libérés et activent les cellules du système immunitaire (macrophages, cellules dendritiques) qui produisent, en réponse, des cytokines pro-inflammatoires pyrogènes (TNF- α , IL-1 β , IL-6, LT α ...) (Fig. 12). Ces cytokines, et plus particulièrement le TNF- α et l'IL-1 β , activent les cellules endothéliales, qui vont (Dunst, Kamena, & Matuschewski, 2017) :

- augmenter l'expression des molécules d'adhésion telles que CD36, ICAM1 et LFA1 à leur surface, exacerbant ainsi le phénomène de séquestration des globules rouges infectés, des plaquettes et des leucocytes.
- sécréter à leur tour des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, (par exemple la protéine chemoattractante monocyttaire 1(MCP-1)),

contribuant probablement aussi à l'inflammation locale, et le recrutement de leucocytes (monocytes, macrophages, neutrophiles et les lymphocytes)

Les cellules endothéliales pouvant elles-aussi sécréter des cytokines et des chimiokines, l'inflammation locale et l'activation endothéliale pourraient être exacerbées.

Encadré 1

Rôle de l'interaction entre PfEMP1 et EPCR dans le neuropaludisme

Dans les micro-vaisseaux sains, l'EPCR favorise un état de quiescence dans les cellules endothéliales (c'est-à-dire le maintien de leurs fonctions anti-coagulante et anti-adhésive) en stimulant l'activation de la protéine C par le complexe thrombine-thrombomoduline. La protéine C activé (PCA) induit les voies de signalisation anti-apoptotiques et anti-inflammatoires dans les cellules endothéliales en clivant PAR1 à Arg46. En outre, la PCA soluble inactive les facteurs de coagulation FV et FVIII, ce qui entraîne un état anti-thrombotique. Dans les cas du neuropaludisme, PfEMP1 bloque le site de liaison de la protéine C dans le récepteur EPCR. L'absence de PCA entraîne une augmentation de la formation de thrombine et supprime le mécanisme de rétroaction négative impliqué dans la régulation de l'inflammation et de la coagulation. La thrombine déclenche des signaux pro-inflammatoires et des signaux de rupture de la barrière endothéliale en clivant PAR1 à Arg41, et favorise la libération d'angiopoïétine 2 et du facteur de von Willebrand par les cellules endothéliales. De plus, la thrombine clive le fibrinogène, ce qui engendre un dépôt de fibrine. ([Bernabeu & Smith, 2017](#); [Samuel Crocodile Wassmer & Grau, 2017](#))

Enfin, un autre acteur immunologique important semble intervenir dans la pathogenèse du neuropaludisme : le lymphocyte T CD8+. Les cellules endothéliales activées, en plus d'une sur-expression d'ICAM-1 permettant de retenir le lymphocyte T CD8+ via une interaction avec LFA-1 à sa surface, sont capables de présenter à ce même lymphocyte des antigènes parasitaires via le CMH de classe I ([Howland et al., 2013](#); [Howland, Poh, & Rénia, 2015](#)). Cette

interaction directe entre les cellules endothéliales cérébrales et les lymphocytes T CD8+ entraînerait leur activation et la libération de perforine (Shaw et al., 2015). En effet, de nombreuses études expérimentales de paludisme cérébral murin ont identifié le rôle pathogène de ces cellules, proposant différents mécanismes liés à la libération de perforine, notamment des mécanismes cytolytique ou apoptotique (Haque et al., 2011; Nitcheu et al., 2003; S. Potter, Chaudhri, Hansen, & Hunt, 1999; Sarah Potter et al., 2006). Ces expériences consistaient principalement à comparer la résistance à l'infection par *PbA* de souris déficientes en perforine par rapport à des souris contrôles. Elles ont ainsi montrées que les souris déficientes en perforine ne développaient pas d'atteintes neurologiques contrairement aux souris contrôles. De récents travaux conduits également chez la souris proposent un rôle non cytolytique de la perforine. Cette dernière serait impliquée dans la perturbation des jonctions serrées des cellules endothéliales cérébrales en agissant sur les protéines claudin-5 et occludine, entraînant ainsi une perméabilité accrue voire la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Huggins et al., 2017; Shaw et al., 2015).

3.2 ANÉMIE SÉVÈRE

L'anémie sévère palustre, caractérisée par un taux d'hémoglobine inférieur à 5g/dl (WHO, 2000), repose sur une élimination excessive des globules rouges infectés et sains (Jakeman, Saul, Hogarth, & Collins, 1999), et à une anomalie dans la production érythrocytaire (dysérythropoïèse) (Anyona et al., 2012; Chang, Tam, & Stevenson, 2004; Thawani et al., 2014).

L'élimination des globules rouges infectés est due à deux processus, à savoir la rupture des schizontes à la fin du cycle érythrocytaire (Phillips & Pasvol, 1992) et la clairance splénique au cours de laquelle, les globules rouges infectés sont soit phagocytés par les macrophages soit retenu au sein de la rate (Buffet et al., 2011; Buffet, Safeukui, Milon, Mercereau-Puijalon, & David, 2009).

Au cours de l'anémie sévère palustre, les globules rouges non parasités sont eux aussi éliminés. Ces globule rouges présentent une plus grande rigidité due à un mécanisme d'oxydation lié à l'infection (Dondorp, Omodeo-Salè, Chotivanich, Taramelli, & White, 2003), et sont donc eux aussi éliminé au niveau de la rate. Ce

n'est pas le seul mécanisme impliqué. En effet ces globules rouges sains, portent à leur surface des protéines parasitaires appartenant à la familles des rophtries (par exemple : RAP-2) qui proviendraient de tentatives d'invasion avortées (Awah, Troye-Blomberg, Berzins, & Gysin, 2009; Layez et al., 2005). Ces protéines sont reconnues par des anticorps spécifiques résultant en une opsonisation et une phagocytose par les macrophages ou encore à une activation du complément aboutissant à une hémolyse. Enfin, de récentes études évoque la mise en place d'un mécanisme apoptotique qui serait aussi responsable de la destruction des globules rouges sains (Totino, Daniel-Ribeiro, & Ferreira-da-Cruz, 2016).

La diminution de la production érythrocytaire implique là encore plusieurs mécanismes. Dans des conditions physiologiques, l'érythropoïèse est le processus permettant le renouvellement des globules rouges. Ce processus a lieu dans la moelle osseuse et implique la prolifération et la maturation des précurseurs érythrocytaires (BSU-E/CSU-E) en réticulocytes puis en érythrocytes, sous l'action d'une cytokine principalement produite dans les reins : l'érythropoïétine (EPO). Au cours de l'infection palustre, ce processus est perturbé entre autre par une diminution de la synthèse d'EPO (principalement chez les adultes) et une inhibition de la réponse des progéniteurs érythrocytaires à l'EPO en raison d'un déséquilibre de la balance de cytokine pro- et anti-inflammatoire. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence qu'une libération excessive d'IFN- γ et de TNF- α , associée au NO (oxyde nitrique), contribuent à une dysérythropoïèse et une érythrophagocytose (Menendez, Fleming, & Alonso, 2000; Perkins et al., 2011).

3.3 DÉTRESSE RESPIRATOIRE

Une des complications majeure du paludisme est le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Ce syndrome est caractérisé par l'incapacité des poumons à fonctionner correctement provoquant chez le patient une augmentation de la fréquence respiratoire et une dyspnée pouvant progresser rapidement et causer la mort. Le SDRA est causé par des lésions de la paroi des capillaires suite à l'infection. Par conséquent, les parois deviennent plus

perméables, entraînant une accumulation de fluide et, ainsi une incapacité du poumon à assurer l'échange d'oxygène et de dioxyde de carbone ([Taylor, Hanson, Turner, White, & Dondorp, 2012](#)).

Tout comme le neuropaludisme, les mécanismes impliqués dans le développement du SDRA sont la réponse inflammatoire exacerbée faisant suite à la rupture des schizontes, l'activation des cellules endothéliales de la barrière alvéolo-capillaire et la séquestration des érythrocytes infectés, conduisant à l'obstruction des micro-vaisseaux et l'hypoxie pulmonaire ([Cabezón Estévez & Górgolas Hernández-Mora, 2016](#)). La perturbation de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire, entraîne le passage de liquide plasmatique dans l'interstitium provoquant un œdème interstitiel. Lorsque la barrière épithéliale est également compromise, le liquide de l'œdème fuit dans les alvéoles ([Van den Steen et al., 2013](#)).

4. FACTEURS DÉTERMINANT LA SÉVÉRITÉ DE L'INFECTION PALUSTRE

La sévérité des manifestations cliniques est déterminée par des interactions complexes entre des facteurs liés à l'hôte, au parasite et au vecteur, mais aussi des facteurs environnementaux et socio-économiques (résumés Fig. 14).

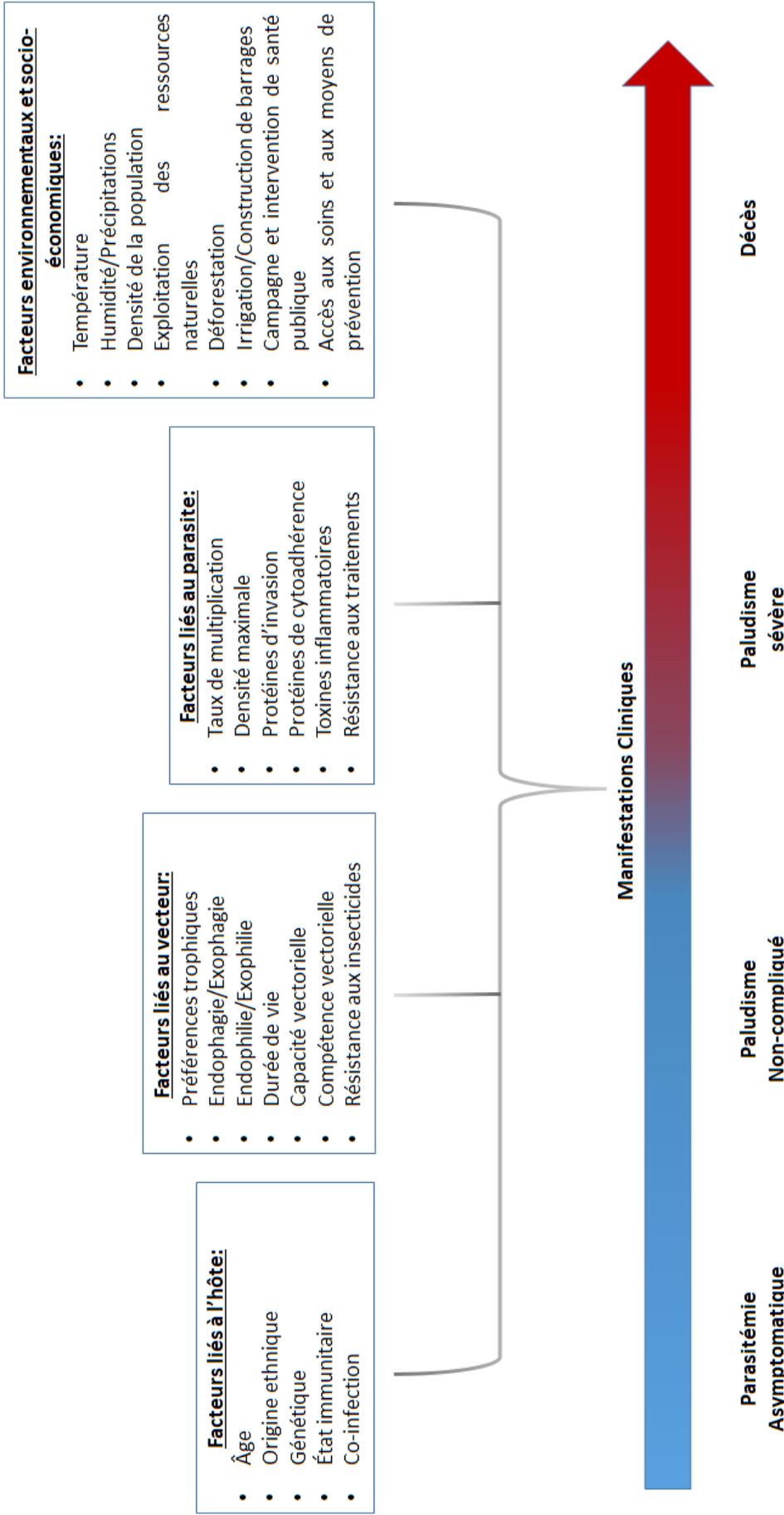


Fig.14. Facteurs déterminant la sévérité du paludisme humain. La susceptibilité à l'infection à *Plasmodium* résulte d'une combinaison complexe de facteurs provenant de l'hôte, du parasite et de l'environnement. Le degré de susceptibilité peut entraîner diverse manifestations cliniques, allant des infections asymptomatiques aux accès sévères et mortels.

Facteurs liés au parasite

La capacité des parasites du paludisme à se multiplier, à adhérer aux tissus de l'hôte, à produire des substances toxiques ou à induire des réponses immunitaires délétères pour l'hôte est considérée comme des attributs de sa virulence. Les différences notées entre les souches et isolats de *Plasmodium* qui déterminent ces attributs incluent :

- la densité parasitaire maximale qu'ils peuvent atteindre ([M. L. Gatton & Cheng, 2004](#)), ainsi que le seuil pyrogénique au-delà duquel ils déclenchent une réponse fébrile chez l'hôte ([Michelle L. Gatton & Cheng, 2002](#))
- leur taux de multiplication ([Simpson, Aarons, Collins, Jeffery, & White, 2002](#)) : En effet, une étude conduite en Thaïlande a montré in vitro que des isolats de *P. falciparum* provenant de personnes atteintes de paludisme sévère présentaient des taux de multiplication trois fois plus élevés que ceux provenant de patients atteints de paludisme non compliqué ([Chotivanich et al., 2000](#))
- les protéines parasitaires à l'origine de l'invasion des globules rouges : à partir d'isolats prélevés sur des cas asymptomatiques, simples et graves de paludisme dans diverses régions géographiques ([Boutlis et al., 2003](#); [Maketa et al., 2015](#); [Nankabirwa et al., 2013](#)), différentes études ont mis en évidence des différences polymorphiques aux niveaux des antigènes de surface impliqués dans l'invasion des érythrocytes, à savoir la famille des protéines de surface des mérozoïtes (MSP), l'antigène 1 de la membrane apicale (AMA1), l'antigène de liaison aux érythrocytes 175 (EBA-175). Ces polymorphismes permettraient au parasite d'échapper à la réponse immunitaire
- les protéines parasitaires à l'origine de leur séquestration ([L. H. Miller, Ackerman, Su, & Wellems, 2013](#)) : La virulence de *P. falciparum* est liée à l'expression de la protéine PfEMP1 à la surface des érythrocytes infectés. Les PfEMP1 exprimés par *Plasmodium* peuvent se lier à différents récepteurs hôtes permettant ainsi la séquestration des érythrocytes infectés dans les différents organes vitaux. Dans le génome de *P. falciparum*, PfEMP1 est codée par une soixantaine de gènes var, qui sont

exprimés d'une manière mutuellement exclusive afin d'éviter la reconnaissance simultanée par le système immunitaire de l'hôte (L. H. Miller et al., 2013). Les anticorps dirigés contre les variants de PfEMP1 seraient responsables de la transition (encore appelée commutation) entre les gènes var dans un processus hiérarchique (Abdi et al., 2017; Warimwe et al., 2009), les parasites exprimant des PfEMP1 conservées et virulents étant finalement surpassés par des variants moins virulents mais plus diversifiés qui persistent dans les infections chez les individus semi-immuns. De plus, ce groupe de gènes principalement situé dans les régions subtélomériques des 14 chromosomes de *Plasmodium*, est caractérisé par une fréquence élevée de recombinaison génique à l'origine d'une grande diversification du répertoire antigénique de PfEMP1, ce qui permet aussi au parasite d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Claessens et al., 2014). Bien qu'ayant une variabilité inter- et intra-génomique importante, les PfEMP1 peuvent être subdivisés en trois grands groupes marqués A, B et C en fonction leur localisation génomique, leur sens de transcription et leur nombre (Lavstsen, Salanti, Jensen, Arnot, & Theander, 2003). Les gènes var du groupe A se sont révélés être exprimés de préférence par des parasites associés aux formes sévères, tandis qu'une plus grande transcription du groupe C a été observée chez des enfants plus âgés atteints de paludisme asymptomatique (Falk et al., 2009; Rottmann et al., 2006). Cette expression différentielle suggère qu'une fois que le répertoire initial des gènes var est épuisé par l'augmentation de l'immunité, le groupe C, ou un autre groupe inconnu de variants de gènes var qui n'interviennent pas dans la cytoadhérence des organes vitaux, pourrait prévaloir dans les infections asymptomatiques

- leur résistance aux traitements (Tjitra et al., 2008).

Facteur environnementaux et socio-économiques

Les changements climatiques et environnementaux sont à l'origine de l'expansion de nombreuses espèces vectrices et de l'intensification de la transmission des agents pathogènes (Patz, Olson, Uejio, & Gibbs, 2008). Par exemple, la déforestation a entraîné dans plusieurs régions tropicales, une

augmentation du taux de piqûres humaines par des vecteurs autrefois zoophiles et l'apparition de nouvelles épidémies palustres (Cox-Singh et al., 2008; Vittor et al., 2006). Des hausses de température historiques ont également été impliquées dans la propagation du paludisme dans de nouveaux habitats et de nouvelles régions (Patz & Olson, 2006).

Des changements environnementaux liés au développement économique peuvent aussi être à l'origine de l'augmentation de la transmission du paludisme. En effet, suite à l'élimination du paludisme dans l'estuaire du Demerara en Guyane (par pulvérisation de DDT), la population humaine s'est rapidement accrue, les activités liées à l'exploitation des terres ont basculé du cheptel à la riziculture plus rentable, et la mécanisation sur les routes et dans les champs ont remplacé le cheval, la mule et les bœufs. Ces changements ont provoqué un tel déséquilibre entre l'homme et le bétail qu' *A. aquasalis*, une espèce très abondante tout le long de la côte, mais qui était jusqu'alors "fixée" par le cheptel, a déplacé son attention du bétail vers l'homme (Giglioli, 1963). L'irrigation et la construction de barrages ont également été liées à une augmentation du risque de paludisme, bien que la nature de l'effet varie considérablement entre les milieux épidémiologiques, entomologiques et socio-économiques (Keiser et al., 2005).

La pauvreté est un autre facteur économique pouvant être tenu pour responsable des transmissions intenses du paludisme. Les foyers les plus modestes n'ont pas les moyens d'accéder aux méthodes de prévention telles que les moustiquaires ou les insecticides, aux soins médicaux et aux traitements antipaludiques (Sachs & Malaney, 2002). En effet, différentes études conduites au Soudan et au Zimbabwe ont montré que le temps passé à se rendre dans un établissement de santé et les frais de transport associés peuvent influencer la décision à chercher un traitement précoce contre le paludisme et donc retarder le diagnostic et le traitement (Malik, Hanafi, Ali, Ahmed, & Mohamed, 2006; Mutsigiri-Murewanhema et al., 2017). La plupart des habitants des zones rurales vivent plus loin des centres de santé. Pour faire face au problème des longues distances entre les communautés et les établissements de santé, qui peuvent entraîner des retards dans le diagnostic et le traitement, le Zimbabwe a introduit la prise en charge communautaire du paludisme par les agents de santé villageois en 2012.

L'autre conséquence de la pauvreté déterminant l'issue de l'infection palustre est la malnutrition. Cette dernière constitue un risque important de paludisme grave et est associée à la mortalité infantile (Mutsigiri-Murewanhema et al., 2017). Différentes études suggèrent que l'amélioration de l'état nutritionnel permet de réduire le nombre de décès liés au paludisme, car elle diminue la gravité des épisodes de paludisme (Caulfield, Richard, & Black, 2004). La malnutrition réduit la fonctionnalité de tous les systèmes du corps. Ainsi, les enfants souffrant d'insuffisance pondérale sont plus vulnérables au paludisme en raison d'une altération de leur système immunitaire (Scrimshaw & SanGiovanni, 1997).

Facteurs liés au vecteur

Les compétences et capacités vectorielles sont des déterminants majeurs de l'intensité de la transmission. La compétence vectorielle se définit comme la capacité intrinsèque d'une espèce d'anophèle à assurer le développement complet du parasite. En effet, l'incapacité de *Plasmodium* à se développer dans certaines espèces d'Anophèles peut s'expliquer par l'absence chez ce moustique de facteurs métaboliques indispensables au développement parasitaire, mais aussi de la présence de toxines ou bactéries inhibant la croissance du parasite ou sa transmission (Bull & Turelli, 2013). Les mécanismes immunitaires du moustique peuvent également perturber le développement du parasite.

La capacité vectorielle, elle, se définit comme la capacité d'une espèce à être infectée et à transmettre le paludisme. Elle dépend des conditions climatiques et géographiques (température, fréquence des précipitations, taux d'humidité, variation saisonnière), du degré d'anthropophilie (caractère déterminé par la génétique du vecteur), l'âge de l'anophèle, la durée de la phase sporogonique (spécifique de l'espèce de *Plasmodium* et de la température extérieure), la durée de vie de l'anophèle et sa résistance aux insecticides (Kelly-Hope, Ranson, & Hemingway, 2008).

Ainsi, la présence et la densité de vecteurs dépendent de conditions locales qui expliquent une part importante de l'hétérogénéité de la distribution du paludisme (Sachs & Malaney, 2002).

Facteurs liés à l'hôte

Enfin, de nombreux facteurs liés à l'hôte sont déterminants dans la sévérité et le devenir de l'infection palustre, notamment l'âge et le sexe, l'origine ethnique, l'immunité, les maladies chroniques concomitantes, les co-infections et divers polymorphismes génétiques.

Dans les zones à faible transmission ou dans les régions où le paludisme est saisonnier, les personnes développent généralement des accès palustres sévères lors d'une infection, comme par exemple au Sri Lanka (Alles, Mendis, & Carter, 1998). De nombreuses études ont montrée que suite à une exposition régulière et répétée (Jean Langhorne, Ndungu, Sponaas, & Marsh, 2008; Marsh & Kinyanjui, 2006), les individus vivant en zone hautement endémique où le paludisme prévaut toute l'année, développent une immunité protectrice non stérilisante (c'est-à-dire qu'elle ne permet pas d'éliminer le parasite de l'organisme) appelée "prémunition". Cette prémunition est labile (elle disparaît entre 1 à 2 ans si le sujet quitte la zone d'endémie) et son développement est progressif (Griffin et al., 2015), avec l'apparition successive d'une immunité clinique (ou « anti-maladie ») offrant une protection contre les formes simples et compliquées de la maladie, suivie d'une immunité anti-parasitaire permettant de réduire la parasitémie en contrôlant la multiplication parasitaire. Alors que les enfants de 6 mois à 5 ans ont les niveaux d'immunité protectrice les plus faibles et sont les plus susceptibles de développer une parasitémie élevée avec des risques de complications et de décès (Marsh & Kinyanjui, 2006), les adultes, eux, sont "prémunis". Les nourrissons (< 6 mois) bénéficient également d'une certaine protection, probablement grâce aux anticorps acquis de leur mère, mais aussi à la présence d'hémoglobine fœtale au sein des érythrocytes (Amaratunga et al., 2011) responsable d'une représentation altérée de PfEMP1 à la surface des globules rouges infectés et donc d'une cytoadhérence altérée, ainsi que les constituants du lait maternel riche en anticorps et pauvre en acide p-aminobenzoïque essentiel à la croissance du parasite (Hawking, 1954; Kassim et al., 2000; Kicska, Ting, Schramm, & Kim, 2003).

Les co-infections peuvent elles-aussi affecter le développement des symptômes en altérant le fonctionnement du système immunitaire. Il a été démontré que l'infection à VIH-1 augmente le taux accès fébriles palustre suite à la diminution

du nombre de lymphocytes T-CD4 (French et al., 2001; González, Ataíde, Naniche, Menéndez, & Mayor, 2012). L'association entre les helminthes transmissibles par le sol et l'apparition de symptômes cliniques chez les enfants atteints de parasitémie palustre est moins évidente : l'infection par l'ankylostomiase semble augmenter les symptômes du paludisme, tandis que l'infection par *Ascaris lumbricoides* semble diminuer les symptômes (Nacher, 2012). La co-infection par *Plasmodium* et *Schistosoma* est fréquente, mais les effets sur l'immunité et la transmission du paludisme sont complexes. Certaines études suggèrent que cette co-infection favorise le développement de l'immunité antipaludique (Diallo et al., 2010; Lyke et al., 2012), tandis que d'autres ont trouvé des niveaux plus faibles d'anticorps antipaludiques protecteurs chez les porteurs de *Schistosoma haematobium* (D. Courtin et al., 2011).

Concernant le contrôle génétique de l'infection palustre : aucune maladie infectieuse n'a façonné le génome humain autant que le paludisme, favorisant l'évolution convergente d'une grande diversité de variations génétiques, touchant les globules rouges mais aussi le système immunitaire (Kwiatkowski, 2005). Ainsi, la répartition géographique (avant l'introduction des mesures de contrôle) du paludisme et des variants impliqués dans les hémoglobinopathies telle que la drépanocytose, l'ovalocytose, les thalassémies, et la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) sont similaires, ce qui suggère que ces troubles confèrent un avantage sélectif aux individus vivant en zone d'endémie palustre (Allison, 2009; López, Saravia, Gomez, Hoebeke, & Patarroyo, 2010). De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes génétiques contrôlant la sévérité des manifestations cliniques du paludisme. Celles-ci seront détaillées dans le chapitre « Génétique humaine et résistance au paludisme ».

LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE L'HÔTE

La grande majorité des travaux sur l'immunité anti-palustre a été menée à l'aide de modèles murins d'infection par le paludisme (R. Stephens, Culleton, & Lamb, 2012) ou d'échantillons prélevés sur des individus naturellement exposés. Les modèles murins permettent une dissection minutieuse des réponses immunitaires dans tous les organes, à des stades d'infection bien définis et dans le contexte de différentes manifestations de la maladie selon la combinaison de la souche parasitaire et de l'hôte murin (Frevert, Nacer, Cabrera, Movila, & Leberl, 2014; Gun, Claser, Tan, & Rénia, 2014; Liehl et al., 2015; Lovegrove et al., 2006; Nduati et al., 2010; Nganou-Makamdop, van Gemert, Arens, Hermsen, & Sauerwein, 2012). Les inconvénients de ces modèles murins sont, d'une part, qu'ils présentent des combinaisons hôtes-pathogènes non naturelles (Pierre Druilhe, Hagan, & Rook, 2002), et que les conclusions tirées ne sont pas toujours transférables à la situation humaine (Mestas & Hughes, 2004), ces derniers présentant des différences au niveau de leur système immunitaire, notamment des différences au niveau des cellules NK ou encore des cellules dendritiques qui sont des composants essentiels de la réponse immunitaire innée (Mary M. Stevenson & Riley, 2004). L'une des principales limites des études sur le terrain est la durée inconnue de l'exposition, qui empêche l'analyse des réponses immunitaires à des moments précis après l'infection, ainsi que l'influence potentielle de co-infections et comorbidités.

Plus récemment, une autre approche a permis de compléter ces études ; il s'agit d'une exposition délibérée de sujets humains aux parasites plasmodiaux dans le cadre de ce que l'on appelle les infections paludéennes humaines contrôlées (CHMI) (McCall et al., 2007; Mpina et al., 2017; Teirlinck et al., 2011a). Cette approche consiste en l'inoculation de sporozoïtes plasmodiaux via le moustique, par injection de sporozoïtes cryo-conservés via différentes voies d'inoculation, ou par injection intraveineuse de parasites du stade sanguin. Après une semaine de réplique cliniquement silencieuse dans le foie, les parasites du stade sanguin sont surveillés au moins une fois par jour par qPCR ou microscopie. Lorsqu'un certain seuil de parasitémie est atteint, les volontaires sont traités avec des médicaments pour éliminer les parasites. Cette méthode a pour avantage de

contrôler l'absence de co-infection par différentes souches, de comorbidités, de cibler des stades particuliers de l'infection et d'établir une corrélation entre les résultats immunologiques et la charge parasitaire grâce à la surveillance des volontaires par PCR. Néanmoins, tout comme les autres approches, elle présente des inconvénients, à savoir une infection restreinte aux adultes, alors que dans les pays endémiques le paludisme est rencontré pour la première fois pendant l'enfance, un traitement médicamenteux précoce obligatoire à des niveaux relativement faibles de parasitémie par rapport à la situation endémique et une dynamique d'infection différente de celle observée lors d'une exposition naturelle (une exposition unique à de multiples piqûres infectantes par rapport à une exposition continue ou régulière à peu de piqûres infectantes).

Ces approches complémentaires ont néanmoins permis d'établir que différents mécanismes immunitaires interviennent au cours de l'infection palustre afin de contrôler les différents stades de l'infection. On peut distinguer une immunité dirigée contre les stades pré-érythrocytaires (Fig. 15), visant à empêcher l'invasion et la croissance du parasite au sein des hépatocytes, et une immunité dirigée contre les stades érythrocytaires (Fig. 16), visant à bloquer l'invasion et la croissance du parasite au sein des globules rouges (M. F. Good & Doolan, 1999) Ces mécanismes immunitaires font intervenir différents acteurs cellulaires et solubles des réponses immunitaires innée et adaptative qui coopèrent tout au long de l'infection.

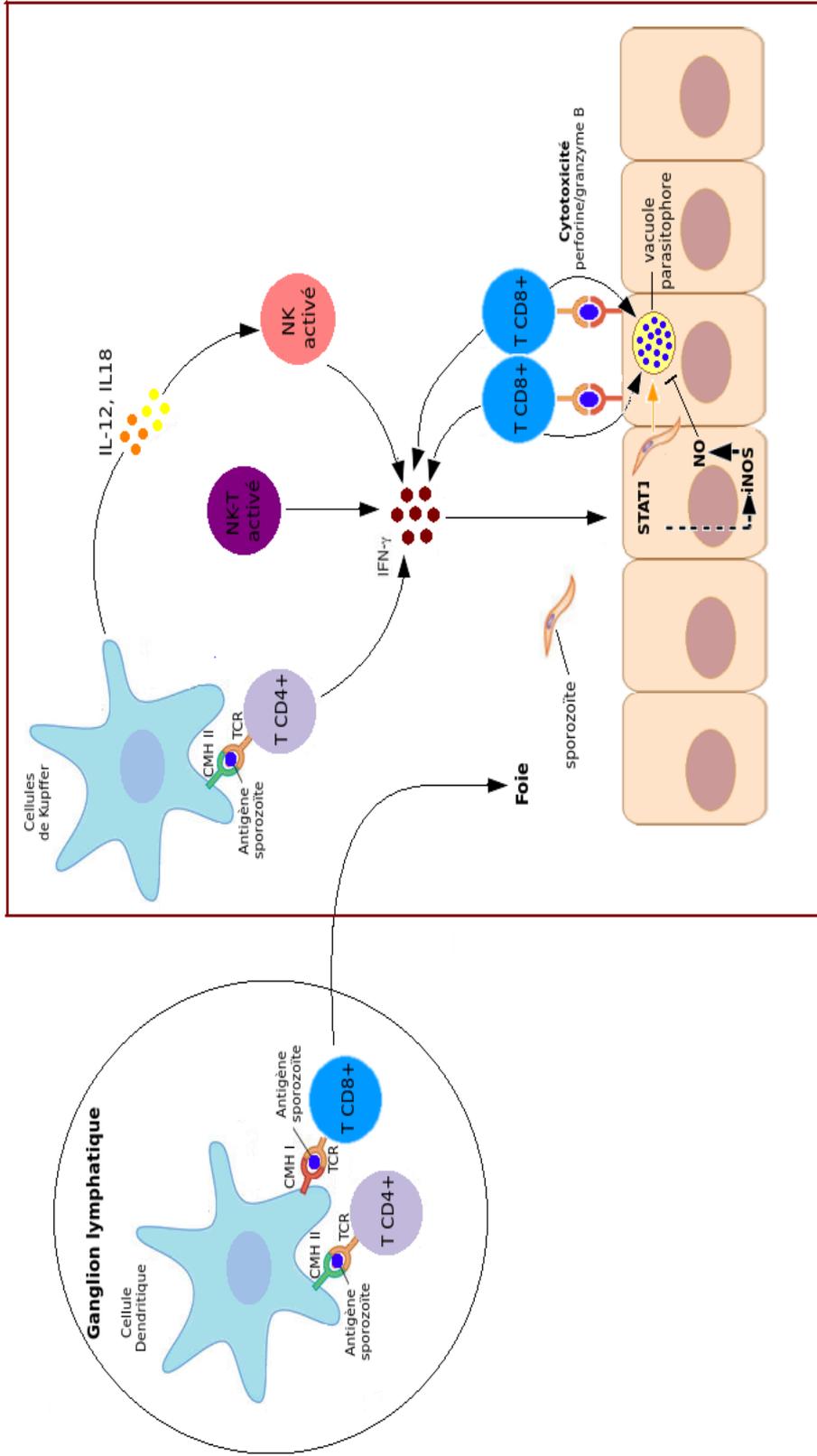


Fig. 15. Réponse immunitaire dirigée contre les stades pré-érythrocytaires. Lors des stades pré-érythrocytaires, les cibles de la réponse T CD8+ spécifique de Plasmodium sont les hépatocytes infectés. Suite à l'activation des T CD8+ par les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4+ au niveau des ganglions lymphatiques drainant le site d'inoculation, ces cellules migrent vers le foie. Là, les hépatocytes infectés présentent à leur surface des épitopes dérivés d'antigènes des stades pré-érythrocytaires, restreints aux molécules de CMH de classe I. Les cellules T CD8+ reconnaissent les complexes CMH de classe I. Les cellules T CD8+ reconnaissent les complexes CMH de classe I. Les cellules T CD8+ reconnaissent les médiateurs cytotoxiques permettant l'élimination des schizontes parasitaires. De plus, la production d'IFNγ par les cellules T-CD8+ activées initie une boucle d'activation positive en stimulant les cellules présentatrices d'antigènes (CPA- monocyte/macrophage, cellule dendritique) à produire de l'IL-12, qui va à son tour induire la production d'IFNγ par les cellules NK activées. Les cellules T CD4+ et les cellules NKT sont également impliquées dans la production d'IFNγ. L'IFNγ va alors stimuler la voie de signalisation de STAT1 qui va activer la production de NO par l'enzyme NO-synthase (iNOS) au sein de hépatocytes infectés. Cette production de NO permet d'inhiber la croissance parasitaire intra-hépatocytaire.

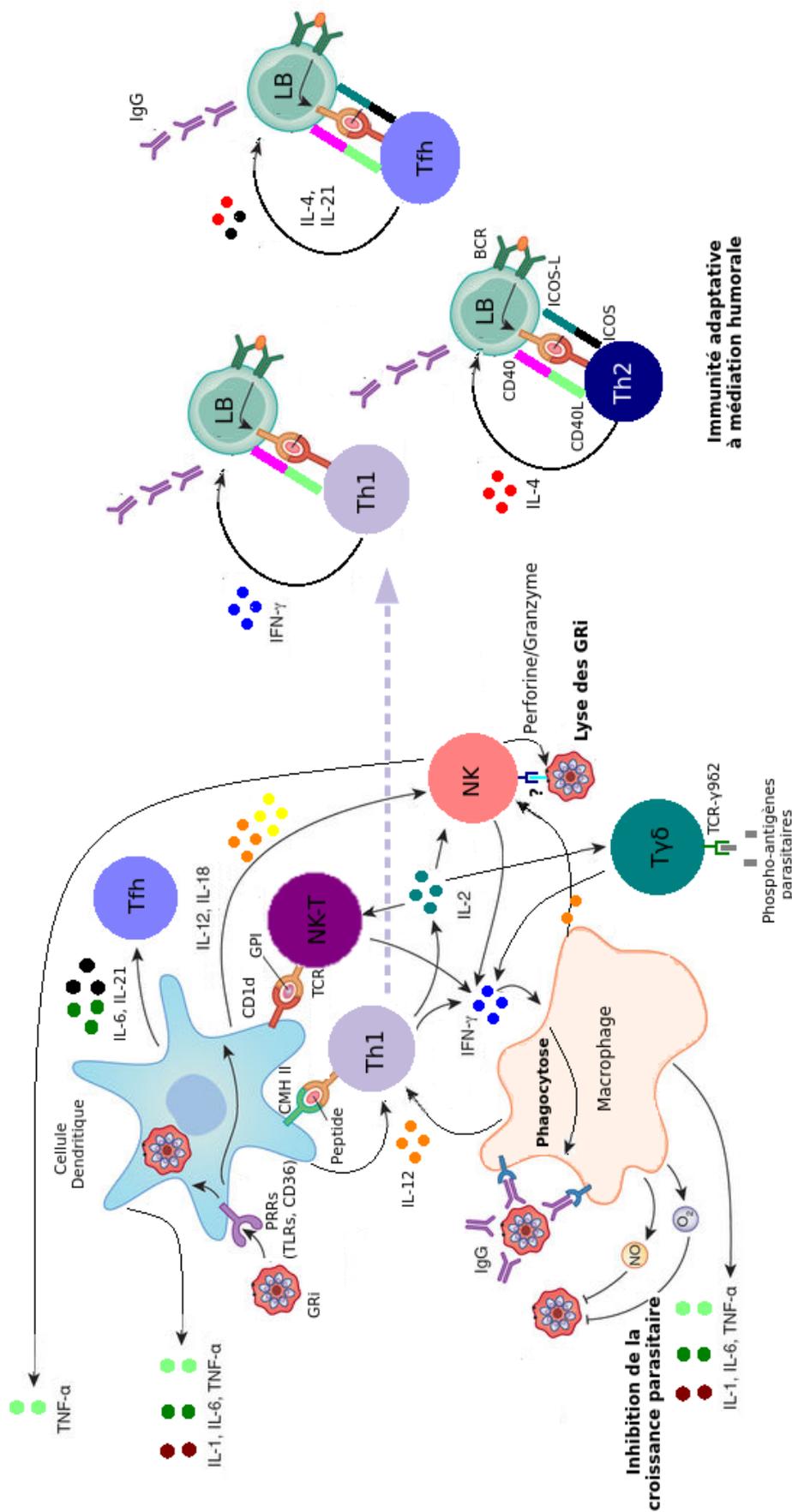


Fig. 16. Réponse immunitaire dirigée contre les stades érythrocytaires. Suite à la reconnaissance des antigènes parasitaires, les acteurs cellulaires de l'immunité innée produisent diverses cytokines qui vont influencer le développement de l'immunité adaptative. Ainsi la reconnaissance des globules rouges infectés par les cellules présentatrices de l'antigène activées (CPA) va entraîner l'activation des cellules Th1 et NK-T via l'interaction du CMH de classe I avec le TCR et l'interaction du CD1d avec le TCR, respectivement, mais aussi la production d'IL-12 et d'IL-18 à l'origine de l'activation des NK et la production d'IL-6 et d'IL-21 à l'origine de l'activation des Tfh. En réponse à cette activation, les cellules Th1, NK-T, NK et Ty62 vont sécréter de l'IFN- γ . Cet IFN- γ stimule les macrophages qui vont être en mesure de phagocytoser les globules rouges infectés mais aussi d'inhiber la croissance parasitaire via la production de NO. Ces macrophages activés vont également sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Par ailleurs, les cellules NK activées vont être à l'origine de la lyse des globules rouges infectés suite à la reconnaissance de ligands à la surface de ces cellules, les cellules Th1, Th2 et Tfh activées vont médier la production d'anticorps par les lymphocytes B, suite à leur interaction directe avec ces dernières et la sécrétion de diverses cytokines.

A. RÉPONSE IMMUNITAIRE ADAPTATIVE

Par définition, la réponse immunitaire adaptative est caractérisée par une spécificité de reconnaissance des antigènes (une grande diversité d'antigènes pouvant être reconnus spécifiquement) et une mémoire permettant au système immunitaire de réagir plus rapidement et plus intensément à un antigène rencontré auparavant. Dans le cas du paludisme, comme suggérée par les études épidémiologiques dans les populations vivant en zone endémique, l'acquisition d'une immunité spécifique est longue et progressive et ce en raison de la nature hautement polymorphe des antigènes du parasite palustre. L'incapacité de générer une immunité protectrice stérilisante suggère que la mémoire immunitaire face à l'infection palustre se développe de manière inadéquate ou que son maintien n'est pas assuré. Plusieurs hypothèses controversées ont été émises pour expliquer ce phénomène d'absence de mémoire immunologique. Récemment, une équipe a montré l'implication d'une protéine parasitaire HRF (Histidin Releasing Factor) dans l'altération de la mise en place de cette réponse ([Demarta-Gatsi et al., 2017](#)). Dans cette étude, les chercheurs ont démontré que HRF induit une surexpression de PD-1 (un récepteur inhibiteur exprimé entre autre par les cellules T) par les lymphocytes T CD4 et CD8. Or, la signalisation par PD-1 empêcherait la conversion de cellules mémoires effectrices T fonctionnelles en cellules mémoire centrales et, par conséquent, réduirait la mémoire immunitaire à long terme ([Charlton et al., 2013](#)). De plus, l'infection des souris par des souches de *Plasmodium* déficientes en HRF (PbNK65 hrf Δ) s'est montrée corrélée avec une augmentation des cellules B mémoires « effectrices » et « centrales » (IgM–IgG⁺ et IgM+IgG– respectivement). Ces résultats indiquent donc que l'inefficacité de la mise en place de la mémoire immunologique serait induite par les stades sanguins du parasite.

Contrairement aux mécanismes liés à la mise en place de la mémoire immunologique suite à l'infection par *Plasmodium*, les mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire adaptative dirigés contre le parasite sont bien documentés. Ils font intervenir différents acteurs appartenant à l'immunité à médiation cellulaire et humorale.

1. IMMUNITÉ À MÉDIATION CELLULAIRE

Rôle des lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle central dans le contrôle immunitaire de l'infection palustre de par leur interaction avec les différents acteurs de l'immunité innée et adaptative via la production de cytokines. En effet, ces cellules T auxiliaires sont capables d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-2 et l'IL-12 ou vers une réponse de type Th2 en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et le TGF- β (C. A. J. Jr et al., 2001). Toutefois, un tel modèle de deux sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ avec différentes fonctions bien définies n'est pas suffisant pour refléter pleinement la complexité de la biologie des lymphocytes T CD4+ observée dans le paludisme humain ou expérimental. En effet, le contrôle de l'infection à *Plasmodium* nécessite des réponses immunitaires strictement régulées, capables de prévenir la réplication des parasites sans provoquer d'effets secondaires néfastes d'une inflammation incontrôlée. Ainsi, le nouveau concept de plasticité des lymphocytes T CD4+ permettrait d'expliquer l'induction et de la régulation des réponses des lymphocytes T CD4+ dans le paludisme (Coomes, Pelly, & Wilson, 2013; Cosmi, Maggi, Santarlasci, Liotta, & Annunziato, 2014; Nakayamada, Takahashi, Kanno, & O'Shea, 2012), et il est fort probable que certains programmes T CD4+ pas encore explorés en profondeur, comme la réponse Tfh, pourraient jouer un rôle critique dans l'issue de l'infection. Néanmoins, ces cellules nécessitent une activation préalable par les cellules présentatrices de l'antigène afin d'exercer leur fonctions effectrices dans la réponse immunitaire dirigée contre les stades pré-érythrocytaire et érythrocytaire.

Stade pré-érythrocytaire

Peu de choses sur la réponse et la régulation des lymphocytes T CD4+ aux stades pré-érythrocytaires sont connus dans les infections naturelles chez l'humain ou dans des modèles expérimentaux. De toute évidence, dans la mesure où des anticorps de type IgG et des lymphocytes B à mémoire sont générés contre un large éventail d'antigènes pré-érythrocytaires, y compris ceux dont

l'expression se limite principalement à ces stades, tels que les protéines CSP, LSA-1 et STARP (Crompton et al., 2010; Felgner et al., 2013; Nahrendorf et al., 2014), les lymphocytes T CD4+ doivent être induits par ces stades de l'infection. En effet, les lymphocytes T CD4+ spécifiques des antigènes pré-érythrocytaires ont été documentés et, dans certains cas, il a été démontré qu'ils étaient corrélés avec la protection chez les humains à la suite d'une infection naturelle (Reece et al., 2004) ou d'une immunisation (Bijker et al., 2014). Cependant, peu de détails sur leur hétérogénéité fonctionnelle sont connus.

À l'aide de souris déficientes en T CD8+ immunisées par des sporozoïtes de *P. yoelii* et *P. berghei* irradiés, il a été démontré que les lymphocytes T CD4+ confèrent une protection contre les stades pré-érythrocytaires des 2 souches parasitaires, même en l'absence de lymphocytes T CD8+ (Oliveira et al., 2008). De plus, les clones de lymphocytes T CD4+ dirigés contre les peptides de CSP protégeraient les souris face à une infection par *P. yoelii*, indépendamment de leur phénotype Th1 ou Th2 (Rénia et al., 1993; Takita-Sonoda et al., 1996). L'emplacement de l'activation des lymphocytes T CD4+ spécifiques des stades pré-érythrocytaires fait encore l'objet de controverses, et peu de données probantes sur l'activation de ces cellules dans le foie sont disponibles. Comme les lymphocytes T CD8+ spécifiques de peptides de la protéine CSP de *P. yoelii* peuvent être activées par des cellules dendritiques (DC) dans les ganglions lymphatiques après une infection par des sporozoïtes (Chakravarty et al., 2007), il est probable que ces mêmes DC soient à l'origine de l'activation des lymphocytes T CD4+ anti-stades pré-érythrocytaires.

Certains sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ pourraient être également essentiels dans l'initiation des réponses immunitaires médiées par les lymphocytes B et des lymphocytes T CD8+. Les lymphocytes T CD4+ sont nécessaires pour assurer la survie des lymphocytes T CD8+ effecteurs et mémoires induits par les sporozoïtes atténués par irradiation (Carvalho et al., 2002; Overstreet, Chen, Cockburn, Tse, & Zavala, 2011). Ce mécanisme dépend de STAT-6 et de l'IL-4, suggérant que les lymphocytes T CD4+ Th2 pourraient être chargés d'aider les lymphocytes T CD8+ (Carvalho et al., 2002). Plus récemment, il a été démontré que les lymphocytes T CD4+ spécifiques de CSP exprimant le CD107a (LAMP-1), marqueur de la dégranulation cytotoxique, ont été induits et associés à la protection contre les stades pré-érythrocytaires après

l'immunisation de volontaires sains par des piqûres de moustiques infectés par *P. falciparum* au cours de la chimioprophylaxie à la chloroquine (Bijker et al., 2014). Rien n'est encore connu sur l'induction des cellules folliculaires Tfh, (un sous-ensemble de T CD4+ impliqué dans les réponses des lymphocytes B dépendants des lymphocytes T), qui sont vraisemblablement activées par des anticorps IgG de haute affinité et qui seraient importantes pour la génération d'anticorps IgG de haute affinité (Crotty, 2011).

Dans l'ensemble, ces données suggèrent un rôle des lymphocytes T CD4+ dans l'immunité protectrice contre l'infection pré-érythrocytaire, dont les mécanismes ne sont pas encore complètement résolus. Une meilleure compréhension de la contribution des différentes populations de T CD4+ dans l'élimination directe des cellules infectées, les réponses médiées par les lymphocytes B et des lymphocytes T CD8+, ainsi que leur rôle régulateur dans l'immunité dirigés contre les stades pré-érythrocytaires du *Plasmodium* semble indispensable dans un contexte où l'accent est actuellement mis sur les vaccins pré-érythrocytaires.

Stade érythrocytaire

De nombreuses études chez l'homme et le modèle murin ont montrées que les cellules T CD4+ jouent aussi un rôle déterminant dans l'acquisition et le maintien de l'immunité protectrice contre les stades sanguins asexués (Huang, Schultz, & Gordon, 1968; J. Langhorne, Gillard, Simon, Slade, & Eichmann, 1989a; Shear, Srinivasan, Nolan, & Ng, 1989; M. M. Stevenson & Tam, 1993; Troye-Blomberg et al., 1985, 1989).

Néanmoins, le paradigme Th1/Th2 a gagné en complexité avec l'identification de nouveaux sous-ensembles de cellules T CD4+ ayant des caractéristiques et des programmes transcriptionnels en charge de conduire les différents destins cellulaires bien distincts (Coomes et al., 2013). Ces programmes de différenciation sont principalement régis par les signaux dérivés des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et du microenvironnement au moment de l'activation des lymphocytes T CD4+. Les cellules dendritiques sont indispensables pour activer efficacement la réponse des lymphocytes T des stades érythrocytaires palustres (Lundie et al., 2008), et il a été démontré que deux sous-ensembles de cellules dendritiques spléniques (CD8- et CD4+)

présentent un antigène pour l'activation des lymphocytes T CD4+ lors d'une infection érythrocytaire avec *P. chabaudi* et *P. berghei*, respectivement (deWalick et al., 2007; Lundie et al., 2008; Sponaas et al., 2006; Voisine, Mastelic, Sponaas, & Langhorne, 2010). Bien qu'on sache que l'IL-12 sécrétée par les cellules dendritiques soit une cytokine importante dans l'induction d'une réponse protectrice dans les infections expérimentales du paludisme (Zhong Su & Stevenson, 2002), la compréhension de la régulation de cette cytokine ou d'autres facteurs nécessaires pour une présentation efficace de l'antigène plasmodial à différents sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ fait toujours défaut. Néanmoins, les cellules dendritiques activées sécrètent l'IL-12, qui stimule les lymphocytes T CD4+ naïfs afin qu'ils se différencient en lymphocytes TH1 sécréteurs d'IFN- γ , et augmente la production d'IFN- γ .

L'IFN- γ , une cytokine produite par les cellules Th1 exprimant le facteur de transcription T-bet, s'est avérée importante pour contrôler le stade érythrocytaire aigu de l'infection à *Plasmodium* dans les modèles murins (Meding, Cheng, Simon-Haarhaus, & Langhorne, 1990; Sauvaget & Fauconnier, 1978; Simon-Haarhaus, Langhorne, & Meding, 1991; Z. Su & Stevenson, 2000). Des expériences de transfert adoptif de T CD4+ effectrices mémoires (dirigées contre MSP-1 de *P. chabaudi*) provenant de souris immunisées à des souris naïves, a permis de montrer que non seulement les cellules T CD4+ effectrices (TE) mais aussi les T CD4+ mémoires effectrices (TEM), toutes deux productrices d'IFN- γ , confèrent une protection partielle contre l'infection à *P. chabaudi* (R. Stephens & Langhorne, 2010). De façon générale, il a été démontré que l'IFN- γ des lymphocytes T CD4+ est important pour maintenir l'immunité durant les stades érythrocytaires de l'infection (da Silva et al., 2013). Cependant, l'IFN- γ n'est pas seulement produit par les cellules T CD4+ T-bet+ Th1 mais aussi par les cellules NK, NKT, T γ δ (McCall & Sauerwein, 2010), ainsi que les cellules T CD8+, et il apparaît difficile de déterminer qui des cellules Th1, de l'IFN- γ ou de l'IFN- γ produit par les cellules Th1 sont les principaux responsables de la protection précoce ou de la pathologie dans le paludisme expérimental (Villegas-Mendez et al., 2012). Les études menées jusqu'à présent pour répondre à ces questions ont donné des résultats contradictoires. Une étude utilisant *P. berghei* ANKA a montré qu'une amplification de la réponse T

CD4⁺ Tbet⁺ IFN γ ⁺ observée chez les souris dépourvues de signalisation IFN de type I est associée à un meilleur contrôle des infections par *P. berghei* ANKA, diminuant ainsi la morbidité et la mortalité liées au neuropaludisme (Haque et al., 2011). En revanche, d'autres ont montré qu'en l'absence de Tbet, un facteur de transcription essentiel à la différenciation Th1, la résistance au paludisme cérébral provoqué par l'infection à *P. berghei* ANKA est améliorée, et le nombre de lymphocytes T CD4⁺ INF γ ⁺ est réduit. Cependant, le contrôle de la réplication des parasites est perdu et les souris succombent d'une hyperparasitémie et d'anémie (Oakley et al., 2013). L'ensemble de ces données suggère l'implication des cellules T CD4⁺ dans le contrôle de la parasitémie. Cette activité anti-parasitaire repose, d'une part, sur leur implication dans des mécanismes à médiation cellulaire, et d'autre part, sur leur capacité à induire une immunité à médiation humorale.

En effet, les stades érythrocytaires de *Plasmodium* permettent aussi d'activer les lymphocytes T CD4⁺ à l'origine de la production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes B. Mais ces cellules TCD4⁺ produisent peu ou pas d'IFN- γ (J. Langhorne et al., 1989a). Il a été démontré que cette réponse coïncidait avec l'apparition des lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IL-4(classiquement les Th2, ou encore les Th2-like) (J. Langhorne et al., 1989a). Une corrélation entre les lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IL-4 et les réponses médiée par les anticorps dirigés contre le parasite a également été observée chez les sujets immunisés contre *P. falciparum* (Troye-Blomberg et al., 1990). Une infection érythrocytaire à *P. chabaudi*, le seul modèle murin qui génère une phase chronique de l'infection (R. Stephens et al., 2012), présente une activation biphasique des lymphocytes T CD4⁺, avec une réponse majeure des lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'FN- γ pendant la phase aiguë, suivie d'une réponse majeure des lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IL-4 pendant la phase chronique (J. Langhorne et al., 1989a; Linke et al., 1996; M. M. Stevenson & Tam, 1993; von der Weid, Kopf, Köhler, & Langhorne, 1994). Ces données ont été interprétées comme une activation précoce des cellules Th1 capables de contrôler la parasitémie par l'activation des macrophages, suivie d'une réponse Th2 chargée d'activer les réponses des cellules B pour compléter l'élimination du parasite (J. Langhorne et al., 1989a; von der Weid & Langhorne, 1993). Cependant, la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ permettant aux lymphocytes B de produire des anticorps spécifiques du

Plasmodium était beaucoup plus élevée que celle des lymphocytes T CD4+ producteurs d'IL-4 ; suggérant la nécessité d'autres lymphocytes T *helper* (J. Langhorne, Gillard, Simon, Slade, & Eichmann, 1989b). Par ailleurs, chez la souris, une stimulation des lymphocytes B par l'IL-4 produite par les Th2 conduit à la production d'IgG1. Or, une étude a montré que le contrôle d'une infection à *P. chabaudi* et la production d'IgG spécifiques, y compris d'anticorps IgG1, était possible même en l'absence totale d'IL-4 (von der Weid et al., 1994). Il semble ainsi que, malgré son attractivité en tant que modèle, le paradigme simple Th1/Th2 ne soit pas suffisant pour expliquer toute la complexité de l'activation des lymphocytes T CD4+ dans les stades érythrocytaires de *Plasmodium*. Plus récemment, un sous-ensemble de lymphocytes T CD4+, les cellules Tfh, qui produisent de l'IL-21, ainsi que de l'IFN- γ et de l'IL-4, a été décrit (Crotty, 2011).

Des réponses Tfh dysfonctionnelles ont été décrites chez des enfants exposés à *P. falciparum*, et seraient responsables d'une altération du développement des réponses cellulaires B protectrices (Obeng-Adjei et al., 2015). L'infection à *P. berghei* chez la souris inhibe la différenciation des Tfh (Ryg-Cornejo et al., 2016), mais l'induction des réponses Tfh chez la souris (par l'utilisation d'antagoniste des inhibiteurs de ces réponses) accélère le contrôle de l'infection chronique à *P. chabaudi* (Butler et al., 2011). Les signaux indispensables à l'activation des Tfh dans l'infection palustre ont été étudiés récemment. Il a été démontré que les molécules de surface OX40, PD-1 et ICOS régulent l'activation des Tfh pendant les infections non létales à *P. yoelii* et *P. chabaudi* (Wikenheiser, Ghosh, Kennedy, & Stumhofer, 2016; Zander et al., 2015). En effet, la neutralisation de la signalisation inhibitrice médiée par PD-1 (Butler et al., 2011; Zander et al., 2015) ou l'activation des signaux co-stimulateurs via la liaison des récepteurs OX40 (Zander et al., 2015), entraîne une expansion des cellules Tfh et améliore l'issue de l'infection non mortelle à *P. yoelii*. Mais, de façon surprenante, la neutralisation concomitante de PD-1 et l'activation de la signalisation OX40 altère de façon marquée la différenciation ou le maintien des cellules Tfh spécifique du parasite de façon INF- γ dépendante, et entraîne la perte de contrôle de la charge parasitaire induit par les anticorps ; ce qui suggère une interférence des deux voies de signalisation. Enfin, bien que la signalisation médiée par ICOS se soit avérée non nécessaire dans l'induction précoce des cellules Tfh dans le modèle non létalement à *P. chabaudi*, l'expression de cette molécule

co-stimulatrice semble nécessaire au Tfh pour maintenir durablement les réponses anticorps spécifiques (Wikenheiser et al., 2016). Et récemment, il a été montré que les lymphocytes T CD4+ produisant de l'IL-21, dont une proportion substantielle a un phénotype de cellules Tfh, sont nécessaires pour activer les réponses IgG dirigées contre *P. chabaudi* et contrôler la phase chronique de cette infection (Pérez-Mazliah et al., 2015). La même équipe a démontré la nécessité de ces cellules Tfh dans l'élimination d'une infection chronique systémique à *P. chabaudi* déclenchée par transmission vectorielle naturelle chez la souris (Pérez-Mazliah et al., 2017). Tous ces résultats suggèrent donc un rôle majeur des Tfh dans le contrôle de l'infection dans l'infection palustre.

Un autre sous-ensemble de lymphocytes T CD4+, celui des lymphocytes Th17, défini par l'expression du facteur de transcription ROR γ t, a attiré l'attention des chercheurs en raison de son rôle dans les maladies auto-immunes et l'inflammation chronique ainsi que dans les réponses aux agents pathogènes extracellulaires tels que les bactéries et les champignons (Z. Chen, Laurence, & O'Shea, 2007). Il a été montré que les cellules Th17 CD4+ IL-17A+ ROR γ t+ sont activées lors d'une infection aiguë à *P. berghei* ANKA et *P. yoelii*, mais leur fonction pendant l'infection n'a pas été explorée (Keswani & Bhattacharyya, 2014). Une étude conduite dans le modèle murin d'infection à *P. berghei* ANKA n'a pas réussi à démontrer une association entre les cellules Th17 et le paludisme cérébral chez les souris déficientes en Th17 infectées (Ishida et al., 2010). La présence de lymphocytes T CD4+ producteurs d'IL-17A et d'IL-17E, principalement dans le foie, a néanmoins été observée au cours de la phase aiguë du stade érythrocytaire de l'infection à *P. chabaudi* ; cependant, les souris déficientes en IL-17A n'ont montré aucune altération significative au cours de l'infection (Mastelic et al., 2012). Par conséquent, malgré l'activation, il n'a pas été démontré jusqu'à présent que les cellules Th17 ont un rôle défini pendant les infections à *Plasmodium*.

L'implication d'autres sous-ensembles de lymphocytes T CD4+, comme les Th22 (producteur d'IL22), continuent à être explorée (Duhon, Geiger, Jarrossay, Lanzavecchia, & Sallusto, 2009; Trifari, Kaplan, Tran, Crellin, & Spits, 2009). Il est intéressant de noter que des polymorphismes de l'IL-22 associés à la résistance et à la susceptibilité au paludisme grave ont été identifiés (O. Koch et al., 2005; Marquet et al., 2017). De plus une activation des lymphocytes T CD4+

produisant de l'IL-22 a été observée dans la rate et le foie pendant les phases aiguës des stades érythrocytaires de l'infection à *P. chabaudi* et les souris déficientes en IL-22 ont présenté des formes sévères (Mastelic et al., 2012). Des recherches sont néanmoins nécessaires pour caractériser avec exactitude le rôle des Th22 dans le contrôle de l'infection et la pathogenèse.

Les lymphocytes T CD4+ sont donc des composantes d'une réponse dynamique et interactive, dans laquelle ces cellules peuvent être multifonctionnelles (c'est-à-dire leur capacité de produire différentes cytokines) et flexibles sous certaines conditions (Nakayamada et al., 2012). De plus, des analyses cytométriques multiparamétriques de PBMC d'enfants et d'adultes exposés à l'infection palustre révèlent l'existence de lymphocytes T CD4+ co-exprimant plusieurs cytokines caractéristiques de nombreux sous-ensembles de lymphocytes T CD4+ (Metenou et al., 2011; Roetynck et al., 2013), démontrant la complexité de la réponse des lymphocytes T CD4+ activée par les stades érythrocytaires de *Plasmodium*.

Il existe de nombreuses évidences d'une grande capacité d'inter-conversion entre les différents phénotypes des T CD4+, concept connu sous le nom de plasticité (Murphy & Stockinger, 2010). Les études les plus récentes suggèrent que l'activation des lymphocytes T CD4+ avec des caractéristiques de différents sous-ensembles Th est la norme plutôt que l'exception (Nakayamada et al., 2012), ce qui est susceptible de se traduire par des maladies complexes comme le paludisme.

À la lumière des capacités multifonctionnelles et plastiques des lymphocytes T CD4+, on peut envisager un scénario dans lequel les sous-ensembles Th nécessaires au contrôle de la charge parasitaire, tels que les lymphocytes Th1 et dans doute Th2, ont la capacité d'acquérir un phénotype régulateur en fonction du contexte, contribuant ainsi à la maîtrise de l'inflammation et donc à la protection des tissus et organes, empêchant tout effet exacerbé et potentiellement nocif de la réponse immune. Cette capacité permettrait une fine régulation de la réponse des lymphocytes T CD4+ dans le contrôle de l'infection à *Plasmodium* sans provoquer d'effets secondaires néfastes. L'un des mécanismes régulateur fait intervenir les cellules Treg. Suite à l'engagement de leur TCR, ces cellules sont capables d'inhiber à la fois la production d'IL-2 et la prolifération des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ par des mécanismes contact-dépendant

et/ou par la production de TGF- β et d'IL-10 (Riley, Wahl, Perkins, & Schofield, 2006). Chez l'homme, une augmentation du nombre de ces cellules et ainsi de la concentration en TGF- β , au cours de l'infection par *P. falciparum*, est associée à une réduction des cytokines pro-inflammatoires, des taux de croissance parasitaire élevés (Walther et al., 2005) et un risque accru de paludisme symptomatique (Todryk et al., 2008). Une étude conduite au Burkina Faso a également suggéré que la forte résistance au paludisme chez les Peules était associée à un déficit fonctionnel des lymphocytes T régulateur (Treg) et ainsi une réduction de l'activité immunosuppressive en comparaison avec les Mossis (Torcia et al., 2008). Un autre mécanisme impliquant une régulation médiée par l'IL-10 est l'autorégulation par les cellules CD4+ Th1. En effet, les lymphocytes T CD4+ Th1 T-bet+ IFN- γ + IL-10+ peuvent prévenir la pathologie pendant l'infection à *P. chabaudi* (Freitas do Rosário et al., 2012). De plus, l'IL-10 produit par les lymphocytes T CD4+, distinct de l'IL-10 produit par les Treg, est capable de contrôler les manifestations cliniques liées à l'infection à *P. yoelii* chez la souris, mais dans ce cas, ces lymphocytes ne sont pas capables de co-exprimer l'IFN- γ (Couper et al., 2008). L'IL-10 est produit dans ces cellules en réponse à l'IL-27 (Freitas do Rosário et al., 2012), bien que les signaux responsables de l'induction de l'IL-27 demeurent inconnus. L'apparition des lymphocytes T CD4+ Th1 T-bet+ IFN- γ + IL-10+ pendant les infections à *Plasmodium* n'est pas limitée aux modèles murins; on a rapporté qu'ils étaient présents dans les PBMC d'enfants vivant dans des régions hautement endémiques (Jagannathan et al., 2014; Portugal et al., 2014; Walther et al., 2009) et leur proportion est plus élevée chez les enfants atteints de paludisme non compliqué que chez les enfants atteints de paludisme grave (Walther et al., 2009).

Enfin, bon nombre des lymphocytes T CD4+ activés dans une infection palustre peuvent subir une interconversion entre des sous-ensembles de cellules définis en fonction de la dose d'antigène, des cellules présentatrices de l'antigène, de l'emplacement et de l'environnement cytokinique, comme ceux décrits pour les sous-ensembles Treg et Th17 (Barbi, Pardoll, & Pan, 2013; Kimura & Kishimoto, 2010). Ainsi, il est possible que les cellules Th17 trouvées dans la rate de souris infectées acquièrent un phénotype régulateur dans d'autres organes ou tissus tels que le cerveau et le foie. La capacité d'identifier et de manipuler ces mécanismes possibles de la plasticité des lymphocytes T CD4+ pendant les

infections à *Plasmodium* serait d'une grande valeur pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Rôle des lymphocytes T CD8+

Stade pré-érythrocytaire

Les premières études utilisant des modèles expérimentaux ont clairement démontré que l'immunité protectrice contre les infections induites par les sporozoïtes nécessite des lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'antigène (Schofield et al., 1987; W. R. Weiss, Sedegah, Beaudoin, Miller, & Good, 1988). Certains de ces lymphocytes T CD8+ spécifiques d'épitopes de la protéine CSP inhibent fortement le développement de parasites du stade hépatique (Romero et al., 1989). Des études ultérieures utilisant des cellules T CD8+ transgéniques portant un récepteur spécifique de la protéine CSP ont démontré que ces cellules T étaient activées principalement dans les ganglions lymphatiques drainant la peau où des sporozoïtes étaient déposés (Chakravarty et al., 2007). Quarante-huit heures après l'immunisation, soit par les piqûres de moustiques infectés irradiés, soit par inoculation intradermique de sporozoïtes irradiés, les lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'épitope produisant de l'IFN- γ ne sont détectées que dans les ganglions lymphatiques drainant le site d'inoculation. En accord avec ces résultats, une autre équipe a démontré que les réponses des lymphocytes T CD8+ générées dans les ganglions lymphatiques étaient suffisantes pour une protection stérile contre les sporozoïtes vivants (Obeid et al., 2013). Une fois que les lymphocytes T CD8+ sont activés dans les ganglions lymphatiques, ils migrent vers d'autres organes lymphoïdes et non lymphoïdes, y compris le foie.

Il est bien établi que les lymphocytes T CD8+ reconnaissent les peptides pathogéniques présentés par les molécules du CMH de classe I à la surface des cellules infectées. Par conséquent, l'élimination des cellules cibles est généralement considérée comme un processus dépendant du contact cellulaire. Ainsi, une étude utilisant des souris BALB/c chimériques dans lesquelles la moelle osseuse a été irradiée et une moelle osseuse de C57BL/6 transférée, a montré qu'une présentation d'antigènes par les cellules hépatiques parenchymateuses, et plus précisément des hépatocytes parasités, est

indispensable, à l'élimination des parasites hépatiques par les lymphocytes T CD8+ effecteurs (Chakravarty et al., 2007). Dans cette étude, des cellules T CD8+ effectrices spécifiques de la protéine CSP provenant de souris BALB/c non chimériques immunisées ont été transférées aux souris C57Bl/6 chimériques avant que des sporozoïtes vivants leurs soient inoculés. Suite à l'inoculation, ces souris chimériques ont pu inhiber le développement des parasites hépatiques. Récemment, l'élimination des hépatocytes parasités par les lymphocytes T CD8+ effecteurs a été visualisée par imagerie intravitale (Cockburn et al., 2013) et a permis d'observer la formation de grandes grappes de lymphocytes T CD8+ autour des hépatocytes infectés. Une reconnaissance spécifique de l'antigène est indispensable à la formation de ces amas de cellules T CD8+. En effet, des antigènes non reconnus par ces T CD 8+ effecteurs n'ont pas permis d'initier la formation de grappes de cellules T CD8+. Plus important encore, la formation de cet amas de lymphocytes T CD8 + est nécessaire à une élimination efficace des hépatocytes parasité et implique une signalisation médiée par les récepteurs couplés à la protéine G, ce qui a été démontré par l'utilisation de toxines pertussiques inhibant ces récepteurs (Cockburn et al., 2013). Dans leur ensemble, ces études d'imagerie in vivo ont démontré que l'élimination des cellules cibles est un processus long qui nécessite le recrutement de plusieurs lymphocytes T pour éliminer l'hépatocyte infecté. En plus de la reconnaissance directe des hépatocytes infectés, les lymphocytes T CD8+ spécifiques des antigènes palustres interviennent dans la protection par la production de plusieurs cytokines effectrices, dont l'IFN- γ et le TNF- α et, dans une certaine mesure, par une réponse cytotoxique via la production de perforine/granzyme B (Nussler et al., 1991; Schofield et al., 1987). Les lymphocytes T CD8+ mémoires résidant du foie exprimeraient des niveaux plus élevés de granzyme B et d'IFN- γ que leurs homologues dans d'autres organes (S.-W. Tse, Cockburn, Zhang, Scott, & Zavala, 2013). Cependant, il est probable que ces deux voies fonctionnent de façon indépendante parce que les cellules T CD8+ dépourvues d'IFN- γ sont capables de limiter la croissance des parasites (Chakravarty, Baldeviano, Overstreet, & Zavala, 2008) et les souris dépourvues de perforine et de FasL peuvent aussi mettre en place une réponse protectrice (Morrot & Zavala, 2004; Sze-Wah Tse, Radtke, & Zavala, 2011).

Comme les cellules infectées par des parasites sont éliminées de manière dépendante du contact cellulaire et que de nombreux lymphocytes T CD8+ sont nécessaires, un nombre suffisamment élevé de lymphocytes T CD8+ antiparasitaires, en particulier dans le foie, est essentiel pour le contrôle précoce des agents pathogènes, car un schizonte qui échappe à l'immunosurveillance peut donner naissance à des milliers de mérozoïtes. Ainsi, le contrôle précoce des pathogènes dans le foie est la clé de la résistance de l'hôte. Ces exigences rigoureuses expliquent en partie les défis de la protection stérile contre les parasites du paludisme.

Stade érythrocytaire

Comme les érythrocytes n'expriment pas les molécules du CMH de classe I, une immunité protectrice conférée par les lymphocytes T CD8+ contre les stades sanguins de l'infection reste controversée. Néanmoins, des études ont montré que la déplétion des lymphocytes T CD8+ entraîne une élimination retardée des stades sanguins de *P. chabaudi* chez la souris (Podoba & Stevenson, 1991). De plus, des réponses de lymphocytes T CD8+ spécifiques des stades sanguins ont été décrites chez les rongeurs (Lau et al., 2011; Müller, Gibbins, Matuschewski, & Hafalla, 2017), et chez l'humain infectés par *P. falciparum* (Woodberry et al., 2009). Une récente étude a même mis en évidence dans le modèle murin, une activité cytotoxique Fas-dépendante des lymphocytes T CD8+ contre des érythroblastes infectés (présentant le CMH de classe I) en collaboration avec les phagocytes (Imai et al., 2015). Ces études suggèrent que les lymphocytes T CD8+, dans une certaine mesure, contribuent à l'immunité protectrice contre l'infection des stades érythrocytaires ; cependant, les lymphocytes T CD8+ ont également été impliqués dans la pathogenèse des formes sévères (Cf. p.54)

2. IMMUNITÉ À MÉDIATION HUMORALE

Les anticorps sont des composantes importantes de cette immunité acquise, comme en témoignent les études de transfert passif dans lesquelles des immunoglobulines issues de sérum d'adultes immuns ont été utilisés avec succès

pour traiter des patients impaludés (Cohen, McGregor, & Carrington, 1961; Sabchareon et al., 1991). Les anticorps sériques, qui sont fabriqués par les plasmocytes, interviennent dans la protection en agissant principalement contre les parasites des stades sanguins asexués qui causent les symptômes cliniques du paludisme. Leurs cibles comprennent :

- les antigènes impliqués dans l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes (MSP1, AMA-1...)(Mueller et al., 2013; Richards & Beeson, 2009)
- les antigènes variables de surface impliqués dans la cytoadhérence, principalement PfEMP1 (Chan, Fowkes, & Beeson, 2014).

Les anticorps pourraient potentiellement agir contre le mérozoïte libre avant qu'il n'envahisse les érythrocytes ou contre le globule rouge infecté avant sa cytoadhésion aux parois endothéliales (Duncan, Hill, & Ellis, 2012; Dutta et al., 2009; O'Donnell et al., 2001; Sanjay Singh et al., 2006); en agissant conjointement avec le complément (Boyle et al., 2015) ou par des mécanismes d'ADCC (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) (P. Druilhe & Pérignon, 1994; Khusmith & Druilhe, 1983; Pérignon & Druilhe, 1994), d'ADCI (inhibition cellulaire dépendante des anticorps) et d'opsono-phagocytose (Chan et al., 2014; D. L. Hill et al., 2013; F. H. Osier et al., 2014) par les cellules phagocytaires, telles que les monocyte/macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles, réduisant ainsi la densité parasitaire et les symptômes cliniques (Fig. 17). Cette gamme de fonctions effectrices est médiée par le fragment cristallisable de l'anticorps (Fc). Parmi les quatre sous-classes d'IgG, les IgG1 et IgG3 peuvent fortement favoriser la liaison des composants du complément et se lier avec une grande affinité aux récepteurs Fc (FcR), notamment les récepteur FcγRIIa et FcγRIIIa (Jafarshad et al., 2007), sur les cellules phagocytaires (Vidarsson, Dekkers, & Rispens, 2014), et sont donc appelés anticorps "cytophiles". Chez les individus naturellement immunisés contre le paludisme, la réponse IgG dirigée contre les antigènes du mérozoïte implique principalement les IgG1 et IgG3 cytophiles (Bouharoun-Tayoun & Druilhe, 1992; David Courtin et al., 2009; Oeuvray et al., 2000; Stanistic et al., 2009), ce qui confirme que les fonctions d'anticorps médiées par la région Fc sont importantes pour l'immunité antipaludique.

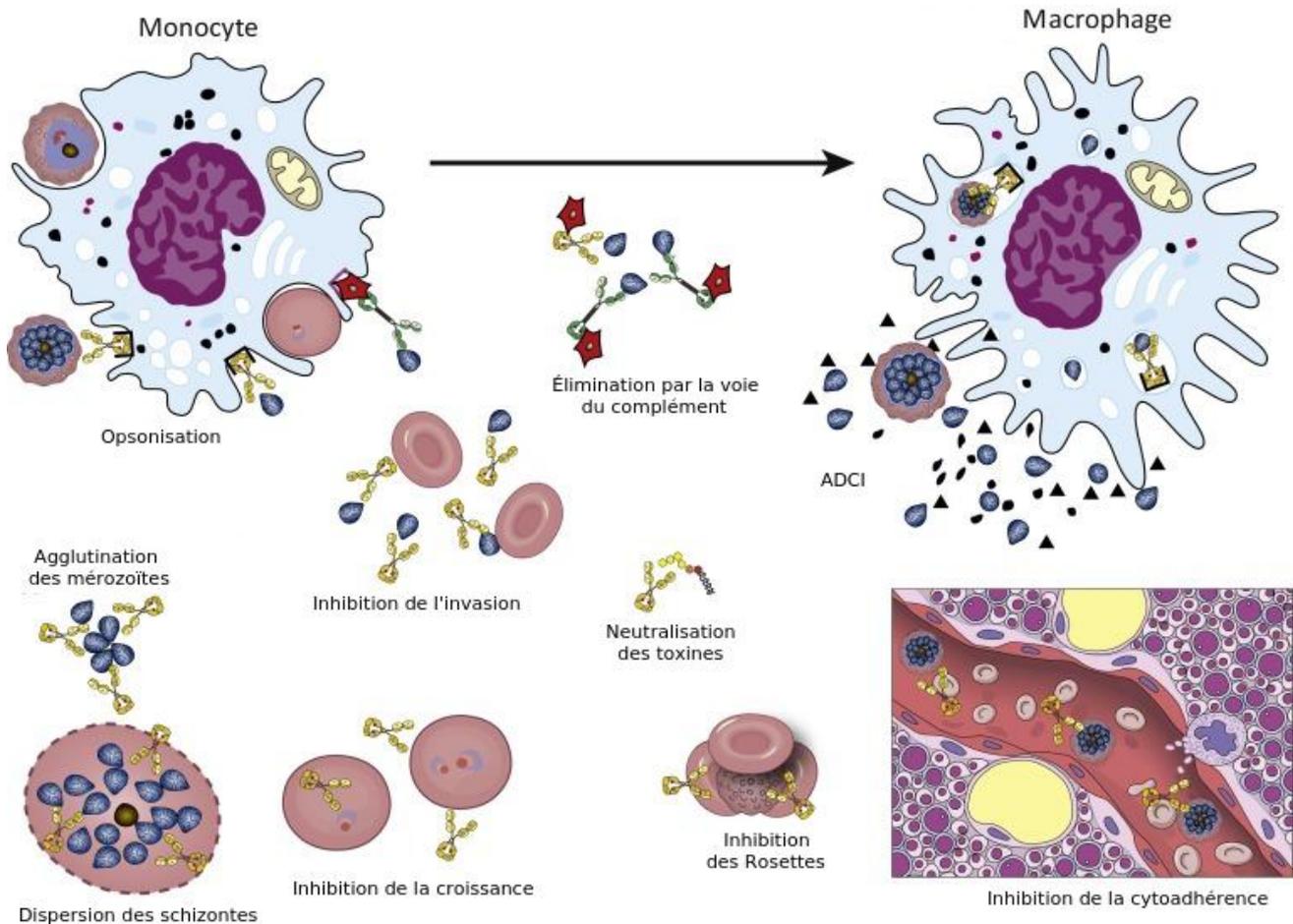


Fig. 17. Mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale dirigée contre les stades érythrocytaires. Les anticorps dirigés contre les mérozoïtes peuvent prévenir l'invasion des érythrocytes; fixer le complément à l'origine de la lyse des mérozoïtes; opsoniser les mérozoïtes afin qu'ils soient adsorbés par les cellules phagocytaires; et stimuler les monocytes et les macrophages pour libérer des molécules qui tuent les parasites érythrocytaires. Les anticorps dirigés contre les globules rouges parasités peuvent bloquer la cytoadhérence de ces globules rouges, perturber les rosettes que les globules rouges parasités forment avec des globules rouges non infectés, et opsoniser ces globules rouges parasités pour permettre leur adsorption par les cellules phagocytaires. Les anticorps reconnaissant la surface des mérozoïtes activent les cellules effectrices, ce qui a pour effet de diminuer la parasitémie (ADCI). Adapté de (A. Teo, Feng, Brown, Beeson, & Rogerson, 2016)

Les monocytes et les macrophages jouent également un rôle important dans l'immunité adaptative humorale via leur capacité de phagocytose et d'inhibition cellulaire dépendante des anticorps (ADCC et ADCI), ainsi que leur capacité à produire des cytokines et des molécules anti-parasitaires, tels que l'oxyde nitrique (NO)(Fritsche, Larcher, Schennach, & Weiss, 2001), suite à leur activation par l'IFN- γ produit par les lymphocytes T CD4+.

L'efficacité de la phagocytose médiée par les anticorps dépend de l'expression des Fc γ Rs par les monocytes. Plusieurs isoformes des Fc γ Rs existent, mais pas toutes ne sont impliquées dans la phagocytose des érythrocytes infectés. En effet, Fc γ RI et Fc γ RIIa peuvent médier la phagocytose des globules rouges

infectés opsonisés par des anticorps (Tebo, Kreamsner, & Luty, 2002), alors que FcγRIIb, un récepteur inhibiteur, atténue les réponses immunitaires (y compris la phagocytose) lorsqu'il est activé (Hunter et al., 1998). D'ailleurs, une étude a montré que le polymorphisme *FcγRIIb*^{T232}, qui se traduit par un dysfonctionnement du FcγRIIb, est associé à une protection contre le paludisme grave (Willcocks et al., 2010), peut-être par l'absence d'effet inhibiteur du FcγRIIb. Cela pourrait permettre aux monocytes/macrophages de phagocyter les globules rouges infectés plus efficacement (Clatworthy et al., 2007). D'autres études ont montré que, les polymorphismes de *FcγRIIa* et *FcγRIIb* peuvent avoir un impact sur le potentiel phagocytaire des monocytes/macrophages et donc influencer leur capacité à éliminer l'infection (K. G. C. Smith & Clatworthy, 2010). Un résidu d'arginine à la position 131 du FcγRIIa (FcγRIIa^{R131}) est capable de médier une liaison de haute affinité avec les IgG1 et les IgG3, tandis qu'un résidu histidine à cette position (FcγRIIa^{H131}) favorise une interaction avec les IgG2 et les IgG3. Comme les IgG1 et les IgG3 sont les principaux isotypes impliqués dans la phagocytose opsonique des globules rouges infectés (Keen et al., 2007), les monocytes portant un récepteur FcγRIIa^{R131} sont plus susceptibles de protéger contre une forte parasitémie (Cooke et al., 2003; Shi et al., 2001). Toutefois, deux études conduites au Burkina Faso et au Brésil suggèrent que, chez les individus porteur de l'allèle H131 du gène *FCGR2A*, les anticorps IgG2 seraient cytophiles et confèreraient une protection à l'infection (Aucan et al., 2000; Leoratti et al., 2008).

Les monocytes ont également montré une activité cytostatique contre les érythrocytes infectés opsonisés par les anticorps via un mécanisme d'ADCI. En effet, l'activation par les globules rouges infectés, entraînerait la libération par les monocytes de médiateurs solubles inconnus capables d'inhiber la croissance et la prolifération des parasites érythrocytaires environnants (Bouharoun-Tayoun, Ouevray, Lunel, & Druilhe, 1995). Là encore, l'efficacité de ce mécanisme dépend de l'expression des FcγR, et plus précisément des récepteurs FcγRII or FcγRIII qui sont les seuls à médier cette activité cytostatique (Bouharoun-Tayoun et al., 1995; Jafarshad et al., 2007).

La variété du répertoire et le taux d'anticorps sont donc importants en termes de réponses protectrices, les individus qui possèdent un plus grand répertoire sont

mieux protégés des formes sévères (Dent et al., 2015; Gray et al., 2007; F. H. A. Osier et al., 2008; Rono et al., 2013).

Il convient de noter aussi que certaines classes d'anticorps, et plus précisément les IgE, sont associées à la pathogenèse des formes sévères (Calissano et al., 2003; Kumsiri, Troye-Blomberg, Pattanapanyasat, Krudsood, & Maneerat, 2016; Perlmann et al., 2000). Ce rôle pathogène serait lié à la capacité des complexes immuns formés par les IgE à induire la production de TNF- α par les monocytes et éventuellement d'autres cellules effectrices après leur fixation aux récepteurs cellulaires Fc ϵ (CD23). Une autre hypothèse pouvant expliquer l'origine de la pathogenèse liée au IgE a été proposée par une récente étude conduite chez la souris qui a montrée que le parasite *PbA* induit la production d'un récepteur pour IgE (Fc ϵ RI) à la surface des neutrophiles (Porcherie et al., 2011). Or, les neutrophiles sont des cellules généralement dépourvues de ce type de récepteur. Les neutrophiles Fc ϵ RI+ se localisent de préférence dans le cerveau et induisent des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires à l'origine du neuropaludisme.

Pour confirmer ce résultat, les chercheurs ont administré ces neutrophiles Fc ϵ RI+ à des souris résistantes au paludisme cérébral (dénuées de ce type de neutrophiles). Ils ont pu ainsi valider que l'interaction des IgE avec le récepteur Fc ϵ RI+ à la surface des neutrophiles était indispensable au développement de la maladie. Ce type de neutrophiles Fc ϵ RI+ a été retrouvé en faible quantité chez les individus atteints de psoriasis, pathologie qui serait notamment induite par l'activation des cellules porteuses de Fc ϵ RI+ par les IgE (Yan et al., 2016). L'implication de ces neutrophiles Fc ϵ RI+ dans les formes sévères de paludisme chez l'homme reste à démontrer.

Toutefois, d'autres observations appuient l'idée selon laquelle des anticorps IgE spécifiques protègent contre le paludisme:

- les taux d'IgE augmentent avec l'âge, ce qui détermine l'acquisition de l'immunité naturelle (R. S. Desowitz, Elm, & Alpers, 1993; Maeno et al., 1993) ;
- chez les individus atteints de paludisme sévère, la concentration d'anticorps IgE contre *P. falciparum* est plus faible chez les patients comateux que chez les patients non comateux (Calissano et al., 2003) ;

- une étude réalisée dans le groupe ethnique Fulani, qui est moins vulnérable aux infections paludéennes, a révélé que les Peuls étaient moins parasités, avaient moins de clones de parasites circulants dans leur sang et avaient des anticorps IgG et IgE spécifiques significativement plus élevés que les Dogons plus sensibles ([Farouk et al., 2005, 2005](#)) ;
- une étude réalisée en Tanzanie a montré qu'un taux élevé d'IgE spécifique réduit le risque d'accès palustres subséquents ([Bereczky et al., 2004](#)) ;
- plus récemment, on a constaté que les anticorps IgE spécifiques d'antigènes chez les patients atteints de paludisme asymptomatique et non compliqué étaient plus élevés que chez les patients atteints de formes graves ([Duarte et al., 2007](#)). Par ailleurs, une analyse en cours dans une population burkinabé conduite par notre équipe montre une corrélation entre un taux d'IgE spécifiques élevé et une faible parasitémie.

Parmi les raisons qui expliquent ces rôles apparemment antagonistes d'IgE dans la maladie palustre, il y a bien sûr la diversité génétique des populations humaines impliquées dans les différentes études, mais aussi les différentes souches parasitaires et les infections concomitantes. Ainsi des études intégrant ces différentes variables pourraient permettre d'évaluer comment la réponse IgE détermine l'issue clinique de l'infection palustre.

D'autres anticorps ciblent les sporozoïtes pré-érythrocytaire (comme par exemple les anticorps anti-CSP, anti-LSA-1 ou anti-TRAP) ([Dups, Pepper, & Cockburn, 2014](#)) et les gamétocytes (par exemple les anticorps anti-Pfs48/45 ou anti-Pfs230) ([Milek et al., 1998](#); [Riley, Williamson, Greenwood, & Kaslow, 1995](#); [Sutherland, 2009](#)). On s'attendrait à ce que les anticorps anti-sporozoïtes préviennent l'infection; toutefois, les données disponibles suggèrent que l'acquisition d'une immunité pré-érythrocytaire protectrice pourrait être limitée ([Hoffman et al., 1987](#); [Michon et al., 2007](#); [Tran et al., 2013](#)), probablement à cause du faible inoculum de parasites dans la salive des moustiques.

B. RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE

1. LES CELLULES DENDRITIQUES

Les cellules dendritiques sont une lignée de cellules phagocytaires mononucléaires spécialisées dans la présentation des antigènes. Leur rôle central dans l'immunité adaptative et innée est liée à leur capacité à capter, traiter et présenter les antigènes aux lymphocytes T, à activer directement les lymphocytes B et à amplifier les réponses immunitaires innées en activant par exemple les lymphocytes NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$ (Wykes & Good, 2008).

Les effets direct d'une infection à *Plasmodium* sur l'activation et la fonction des cellules dendritiques chez l'homme est très controversée. En effet, la première étude s'y étant intéressée, a montré in vitro que les globules rouges infectés (GRi) par *P. falciparum* étaient capables de se lier via PfEMP1 au récepteur « scavenger » CD36 exprimé à la surface des cellules dendritiques humaines et d'inhiber leur maturation, réduisant ainsi leur capacité à stimuler les réponses des lymphocytes T (Urban et al., 1999). Ces résultats ont été remis en question par une étude plus récente qui, elle, a montré que cette inhibition est dose dépendante et ne nécessite pas de contact entre les cellules dendritiques (DC) et les érythrocytes parasités. En outre dans cette étude, lorsqu'une faible dose de globules rouges infectés a été utilisée (ratio 10 GRi : 1 DC), les cellules dendritiques ont atteint efficacement leur maturation et ont activé la prolifération des lymphocytes T (Elliott et al., 2007). En revanche, lorsqu'une forte dose a été utilisé (ratio 100 GRi : 1 DC), la maturation des cellules dendritique est inhibées, ainsi que l'activation des lymphocytes T. On peut supposer, que dans un contexte d'infection naturelle, une faible parasitémie serait à l'origine de la maturation des cellules dendritiques et de l'activation subséquente des lymphocytes T ; et une parasitémie élevée serait à l'origine d'une inhibition de la maturation des cellules dendritiques et de la prolifération des cellules T, et serait ainsi un moyen d'évasion du parasite.

Dans une étude conduite dans une sous-population d'enfants kényans, aucun changement du nombre de cellules dendritiques myéloïdes CD1c+ et plasmacytoïdes n'a été observé entre la phase aiguë de l'infection et la phase de

rémission (Urban et al., 2006). En revanche, le nombre de cellules dendritiques myéloïdes BDCA3+ (sous-groupe de cellules dendritiques des organes lymphoïdes) s'est montré significativement plus élevé chez les enfants atteints de formes sévères par rapport aux enfants sains.

D'autres études de terrain se sont intéressées au fonctionnement des cellules dendritiques pendant l'infection à *P. vivax*. Des paramètres comme le nombre de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) et myéloïdes (mDC) ont été évalués chez des sujets infectés en Thaïlande et au Brésil, et une diminution du rapport mDC/pDC a été observée dans les deux études (Gonçalves et al., 2010; Jangpatarapongsa et al., 2008). En outre, 1/3 des patients brésiliens infectés par *P. vivax* présentaient une faible expression de CD86 à la surface de leurs DC (Gonçalves et al., 2010). Une réduction similaire des taux de CD86, ainsi que de CD83 et de HLA-DR, a été observée chez des patients indonésiens infectés par *P. falciparum* et *P. vivax* (Pinzon-Charry et al., 2013). Dans cette étude, cette réduction était corrélée à une augmentation de l'apoptose spontanée des cellules dendritiques et à une altération de leur capacité à capturer, apprêter et présenter les antigènes aux cellules T (Pinzon-Charry et al., 2013). Enfin, une dernière étude conduite en Indonésie, a montré une conservation voire une augmentation d'expression de HLA-DR à la surface des cellules dendritiques chez des individus ayant une parasitémie asymptomatique à *P. vivax* ou *P. falciparum* en comparaison aux individus atteints d'accès palustres simples (Kho et al., 2015). Ces résultats peuvent indiquer que la fonction des cellules dendritiques est préservée chez les patients infectés asymptomatiques, ce qui suggérerait que les cellules dendritiques fonctionnelles sont importantes pour le maintien d'une immunité clinique, mais non parasitaire. Dans l'ensemble, la question de savoir si l'infection à *Plasmodium* chez les humains induit ou altère l'activation et la fonctionnalité des cellules dendritiques demeure non résolue.

Stade pré-érythrocytaire

Il a été démontré que les cellules dendritiques pulsées avec des extraits de sporozoïtes provoquent l'élimination spécifique des stades exo-érythrocytaires de *P. vivax* dans les hépatocytes infectés via l'activation des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (Vichchathorn et al., 2006), tandis que les cellules dendritiques pulsées avec un épitope de cellules T CD8+ dérivé de la protéine CSP de *P. yoelii*

réduisent la charge parasitaire hépatique chez les souris BALB/c après infection avec des sporozoïtes de *P. yoelii* (Bruña-Romero & Rodriguez, 2001). Des études d'imagerie in vivo ont montré que les cellules dendritiques résidentes du ganglion lymphatique emprisonnent les parasites et, dans les 12 heures (voire moins), présentent l'antigène du sporozoïte aux cellules T CD8+ naïves. L'analyse histo-cytométrique a montré également que la présentation de l'antigène est presque exclusivement médiée par les cellules dendritiques CD8α+ (Radtke, Tse, & Zavala, 2015). L'importance de ce sous ensemble de cellules dendritiques a été renforcé par d'autres études conduites chez des souris déficientes en BATF3, c'est-à-dire dépourvue de ce sous-ensemble, qui ont montré des réponses altérées de cellules T CD8+ après immunisation avec des sporozoïtes (Lau et al., 2014; Montagna, Biswas, Hildner, Matuschewski, & Dunay, 2015; Radtke et al., 2015). Enfin, une récente étude a montré que la réponse protectrice des cellules T CD8+ contre une souche de *P. yoelii* génétiquement modifiée dépendait de la maturation efficace des cellules dendritiques obtenue par signalisation CD40 (Murray et al., 2015).

Le fait que les cellules dendritiques soient capables d'induire une réponse des cellules T CD8+ contre les antigènes exprimés au stade pré-érythrocytaire semble incontestable. Toutefois, une observation faite par Ocaña-Morgner *et al.* a ajouté un niveau de complexité supplémentaire à la fonction des cellules dendritiques dans les stades hépatiques. En effet, cette étude du stade sanguin de *P. yoelii* 17XNL a montré que les cellules dendritiques de souris infectées présentent un phénotype immature et sont incapables d'initier une réponse des lymphocytes T CD8+ contre les antigènes du stade hépatique, suggérant l'inhibition d'une réponse protectrice contre ce stade lors d'une réinfection (Ocaña-Morgner, Mota, & Rodriguez, 2003). Un facteur soluble non identifié, libéré par les globules rouges infectés, serait responsable de l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques (Orengo, Wong, Ocaña-Morgner, & Rodriguez, 2008). Néanmoins, cette inhibition serait dose-dépendante et réversible.

Stade érythrocytaire

Le rôle des cellules dendritiques dans l'activation de la réponse des lymphocytes T CD4+ a également été évalué au cours de l'infection à *P. yoelii*. Les cellules

dendritiques issues de souris infectées (6e jour) ont présenté une expression plus élevée des molécules de co-stimulation, le CD80 et le CD40, et ont été en mesure de présenter efficacement des antigènes aux cellules T CD4+ qui, à leur tour, ont produit des niveaux plus élevés d'IL-2, d'IFN γ et de TNF α . La production de ces cytokines a nécessité une sécrétion d'IL12 par ces cellules dendritiques (Luyendyk, Olivas, Ginger, & Avery, 2002; Perry, Rush, Wilson, Olver, & Avery, 2004).

Les infections à *P. chabaudi* ont également mis en lumière le rôle des cellules dendritiques dans le paludisme. Des études in vitro ont montré que les schizontes de *P. chabaudi* induisent une expression de CMH de classe II, de molécules de co-stimulation ainsi qu'une production d'IL-6, d'IL12 et de TNF α par les cellules dendritiques (Seixas, Cross, Quin, & Langhorne, 2001). Le rôle des cellules dendritiques CD8 α +CD11b- et CD8 α -CD11b+ dans la présentation de l'antigène et l'activation spécifique des lymphocytes T CD4+ a également été étudié. Malgré le fait que ces deux sous-ensembles induisent une production d'IFN γ par les lymphocytes T, seules les cellules dendritiques CD8 α -CD11b+ isolées lors du pic d'infection (7e jour) ont pu induire une prolifération des cellules T CD4+ et une production importante d'IL-4 et d'IL-10 par ces cellules (Sponaas et al., 2006), ce qui suggère que ce sous-ensemble pourrait être responsable du passage d'une réponse pro-inflammatoire Th1 observée au cours des premiers jours à une réponse anti-inflammatoire Th2. Cependant, une autre étude a montré que les 10e et 13e jours après l'infection à *P. chabaudi*, les cellules dendritiques CD8 α -CD11b+ ne sont plus en mesure d'induire la prolifération des cellules T CD4+ ou la production de cytokines en raison d'une réduction des molécules de co-stimulation à leur surface et d'une production d'IL-12 réduite (Sponaas, Belyaev, Falck-Hansen, Potocnik, & Langhorne, 2012). Néanmoins, la réponse des lymphocytes T CD4+ in vivo se rétablit plus tard et les souris sont capables de contrôler l'infection (Jean Langhorne et al., 2008). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes ont également été étudiées dans ce modèle et, malgré une augmentation de leur nombre pendant l'infection, elles n'ont joué aucun rôle dans l'activation des lymphocytes T CD4+ ni dans le contrôle de l'infection (Voisine et al., 2010). Par contre, dans un modèle d'infection à *P. yoelii*, le nombre de cellules dendritiques plasmacytoïdes a augmenté au jour 6 et est demeuré élevé jusqu'au jour 14, et

elles ont été capables d'activer des lymphocytes T CD4+ exprimant l'IL-10 (Wong & Rodriguez, 2008). L'ensemble de ces résultats suggèrent que différents sous-ensembles de cellules dendritiques auraient des fonctions différentes au cours du stade sanguin de l'infection palustre, les cellules dendritiques myéloïdes participant à l'induction de la réponse pro-inflammatoire à un stade précoce et les cellules dendritiques plasmacytoïdes permettant une réponse plus équilibrée à un stade ultérieur.

Les cellules dendritiques sont capables de lier et d'internaliser les globules rouges infectés par *P. chabaudi*. Ainsi, il a été démontré que l'internalisation des globules rouges infectés était associée là encore, à une sur-expression des molécules de CMH de classe II et de molécules de co-stimulation, à la production d'IL-12 et à la stimulation de la prolifération des lymphocytes T CD4+ et de leur production d'IFN γ (Ing, Segura, Thawani, Tam, & Stevenson, 2006). De plus, une étude récente utilisant la microscopie intravitale chez la souris a montré que les cellules dendritiques spléniques interagissent non seulement avec les lymphocytes T CD4+ dans les régions riches en lymphocytes T et dans la pulpe rouge, mais aussi avec les globules rouges infectés dans un processus de phagocytose, contribuant directement à leur élimination lors de l'infection aiguë (Borges da Silva et al., 2015).

Les cellules dendritiques jouent également un rôle important dans l'activation directe des cellules B, via la production d'un facteur d'activation de ces cellules (BAFF) qui améliore leur différenciation et leur survie (Avery et al., 2003). En effet, au cours de l'infection à *P. yoelii*, une diminution du pourcentage de cellules dendritiques exprimant le BAFF a été observée. Cette diminution a été corrélée à une réduction de leur capacité à entraîner la différenciation des cellules B mémoire en cellules sécrétrices d'anticorps (Liu et al., 2012). Enfin, outre les cellules T et B, les cellules dendritiques sont également capables d'interagir avec des cellules immunitaires innées telles que les cellules NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$. La déplétion des cellules NK pendant l'infection à *P. berghei* ANKA entraîne une réduction significative de l'activation des cellules T CD8+ par les cellules dendritiques, mais n'a pas affecté les cellules T CD4+. Il semblerait que les cellules NK stimulent les cellules dendritiques qui en réponse produisent l'IL-12 nécessaire pour une activation optimale des cellules T. L'effet des cellules dendritiques sur la fonction des cellules NK a également été évaluée, et la

déplétion des cellules dendritiques chez la souris infectée par *PbA* réduit les réponses IFN γ médiées par les cellules NK contre cette espèce de *Plasmodium* (Ryg-Cornejo et al., 2013). De la même manière, les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent également communiquer avec les cellules dendritiques via l'expression du CD40L et la production d'IFN γ qui, à son tour, permet l'activation des cellules dendritiques (Inoue, Niikura, Mineo, & Kobayashi, 2013).

Toutes ces réponses ne sont possibles qu'après reconnaissance du parasite palustre via différents types de récepteurs exprimés à la surface des cellules dendritiques. Mais quels sont ces récepteurs ? Quelles molécules reconnaissent-elles ? Et quels sont les effets de ces interactions sur les fonctions des cellules dendritiques ?

L'expression de TLR à la surface des cellules dendritiques a été étudiée chez des patients infectés par *P. falciparum*. Ces derniers manifestant des formes bénignes et sévères de la maladie ont présenté une expression accrue de TLR2 et de TLR4 à la surface des cellules dendritiques myéloïdes et une diminution de l'expression intracellulaire de TLR9 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes, comparativement aux témoins sains (Loharungsikul et al., 2008). Toutefois, une autre étude a montré que la voie de signalisation TLR9-MyD88 était nécessaire pour l'activation des cellules dendritiques plasmacytoïdes lors de la stimulation à l'aide de schizontes (Pichyangkul et al., 2004). D'autres travaux utilisant des souris infectées par *P. chabaudi* ont montré que les cellules dendritiques issues des souris déficiente en MyD88, mais pas celles issues de souris déficientes en TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 ou CD14, ne sont pas capables de produire des cytokines pro-inflammatoires et d'induire une réponse des lymphocytes T CD4+ (Franklin et al., 2007). Ces résultats suggèrent que la voie MyD88 est nécessaire dans l'induction de réponses pro-inflammatoires et l'activation des lymphocytes T, mais que l'interaction de différents ligands avec d'autres TLR peuvent activer cette voie.

D'autres études plus approfondies se sont intéressées aux molécules parasitaires liant ces TLR et plus particulièrement à l'hémozoïne et au glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Gazzinelli, Kalantari, Fitzgerald, & Golenbock, 2014). Concernant l'hémozoïne, des résultats contradictoires ont été obtenus et son rôle est toujours controversé. Initialement, il a été démontré que

l'hémozoïne était présente dans les macrophages et les monocytes en circulation pendant l'infection à *P. falciparum*, réduisant ainsi leur capacité à phagocyter d'autres particules ou à générer une réponse oxydative (Schwarzer, Alessio, Ulliers, & Arese, 1998). Des monocytes humains ayant internalisé des molécules d'hémozoïne puis ayant été différenciés, *in vitro*, en cellules dendritiques ont présenté une altération de l'expression des molécules de CMH de classe II et des molécules co-stimulatrices (O. A. Skorokhod, Alessio, Mordmüller, Arese, & Schwarzer, 2004; O. Skorokhod, Schwarzer, Grune, & Arese, 2005), tandis que des cellules dendritiques dérivées de monocytes incubées avec des molécules d'hémozoïne de synthèse ont montré une sur-expression de molécules de co-stimulation et une libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-6) et anti-inflammatoires (IL-10 et TNF α mais pas d'IL-12) entraînant une activation suboptimale de cellule T (Bujila *et al.*, 2016; Giusti *et al.*, 2011). En outre, dans un modèle d'infection à *P. chabaudi*, les cellules dendritiques contenant de l'hémozoïne n'ont pas été en mesure d'activer complètement les lymphocytes T et ceci en raison d'une interaction altérée (Millington *et al.*, 2007; Millington, Di Lorenzo, Phillips, Garside, & Brewer, 2006).

Différents résultats ont montré que seule l'hémozoïne des globules rouges infectés par *P. falciparum*, et non l'hématine (hémozoïne synthétique), est capable d'induire des cellules dendritiques dérivées de monocytes humains à sur-exprimer les molécules de co-stimulation (CD83, CD86 et CD1a) et à produire de l'IL-12 (Coban, Ishii, Sullivan, & Kumar, 2002). Une étude menée par le même groupe a précisé que cet effet dépendait d'une activation médiée par le TLR9 et Myd88, et non de TLR2, TLR4, TLR7 ou TRIF (Coban *et al.*, 2005). Contrairement à ces auteurs, Parroche *et al.* ont montré que l'hémozoïne n'est pas un ligand direct pour le TLR9, mais qu'elle agit plutôt comme un transporteur de l'ADN plasmodial qui est phagocyté par les cellules dendritiques puis transporté dans les compartiments intracellulaires (Parroche *et al.*, 2007). Enfin, Wu *et coll.* ont soutenu que l'hémozoïne n'était ni un ligand du TLR9 ni un transporteur. Leurs résultats ont plutôt montré que c'est un complexe ADN-protéine qui est à l'origine de l'activation des cellules dendritiques via la signalisation TLR9 (Wu, Gowda, Kumar, & Gowda, 2010). De plus, l'hémozoïne s'est également montré capable d'activer l'inflammasome NLRP3 au cours d'infections expérimentales par le paludisme (Dostert *et al.*, 2009; Shio *et al.*, 2009).

Les ancrages GPI se sont avérés eux aussi doué d'une grande capacité à lier les cellules dendritiques. Ainsi, les ancrages GPI issues de mérozoïtes de *P. falciparum* induisent la production de cytokines pro-inflammatoires et de NO par les macrophages et les cellules dendritiques (Kumar, Gowda, Wu, Gowda, & Gowda, 2012; Tachado et al., 1996; Zhu, Krishnegowda, & Gowda, 2005) principalement via une interaction avec le TLR2 mais aussi, dans une moindre mesure, avec le TLR4 (Zhu et al., 2005), ce qui nécessite une coopération avec le CD36 (Erdman et al., 2009).

2. LES MONOCYTES / MACROPHAGES

Outre leur fonction en tant que cellules présentatrices d'antigènes parasites au cours de l'infection palustre, les monocytes et les macrophages jouent un rôle majeur dans l'immunité innée via leur capacité de phagocytose non-opsonique ou médiée par le complément (via le récepteur du complément 1) (Roestenberg et al., 2007; Silver, Higgins, McDonald, & Kain, 2010) des érythrocytes infectés et des mérozoïtes libres (Tham et al., 2010).

Jusqu'à présent, seul le récepteur scavenger CD36 a été directement impliqué dans l'adsorption non-opsonique des érythrocytes infectés. En effet, une étude a montré que des macrophages issues de souris KO pour le gène codant le CD36 phagocytent 80 % moins de globules rouges parasités que les macrophages des souris sauvages (Patel et al., 2004). L'efficacité de la phagocytose médiée par ce récepteur dépend de divers facteurs, dont le phénotype des molécules d'adhésion parasites, et plus particulièrement de PfEMP1. Par exemple, les érythrocytes infectés du placenta se lient de préférence à la chondroïtine sulfate A, mais ne se lient généralement pas au CD36, ce qui permet aux parasites gestationnel d'éviter une clairance précoce par les monocytes/macrophages (Hviid, Marinho, Staalsoe, & Penha-Gonçalves, 2010; Serghides, Patel, Ayi, & Kain, 2006).

Tout comme pour les cellules dendritiques, la production de cytokines par les monocytes/macrophages dépend du récepteur impliqué et du ligand parasite reconnu, mais aussi du mécanisme phagocytaire engagé. Ainsi, la phagocytose non-opsonique des érythrocytes infectés médiée par les récepteurs CD36 n'induit pas la production de TNF- α , même en présence d'agonistes de TLR (Erdman et al., 2009) ; contrairement à la phagocytose médiée par les récepteurs Fc γ R, qui

favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Ludlow et al., 2012). Les réponses des cytokines par les monocytes/macrophages peuvent donc différer entre les individus immunisés et non immunisés, ce qui peut contribuer à leurs différentes capacités à éliminer l'infection.

3. LES CELLULES T $\gamma\delta$

Les cellules T $\gamma\delta$ sont des lymphocytes non conventionnels exprimant un TCR composé de chaînes γ et δ et dont le système de reconnaissance de l'antigène diffère de celui des lymphocytes T $\alpha\beta$ _ à savoir qu'elles ne nécessitent pas une présentation de l'antigène par les molécules de CMH. Bien qu'elles constituent une très petite population de cellules dans le sang périphérique, plusieurs études ont montré leur implication dans la réponse immunitaire précoce contre les stades érythrocytaires de l'infection palustre. En effet, il a été observé que cette population de cellule prolifère fortement, produit des cytokines pro-inflammatoires en réponse à la stimulation par Plasmodium et s'étend de manière marquée après une infection palustre chez des hôtes naïfs (Behr & Dubois, 1992; Goodier, Lundqvist, Hammarström, Troye-Blomberg, & Langhorne, 1995; Roussillon, Agrapart, Ballet, & Bensussan, 1990; Seder et al., 2013; Teirlinck et al., 2011b, 2015).

Ces cellules, et plus particulièrement le sous-ensemble V γ 9V δ 2, réagissent rapidement aux phospho-antigènes produits par l'apicoplaste plasmodial et il a été démontré qu'elles inhibent in vitro la croissance des parasites par la libération de granules cytotoxiques contenant de la granulysine (Costa et al., 2011; Elloso, van der Heyde, vande Waa, Manning, & Weidanz, 1994). Compte tenu de ces attributs, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent fonctionner comme des cellules effectrices prêtes à l'emploi et donc être très importantes au début de la réponse à l'infection palustre. Corroborant cette hypothèse, une étude conduite en Papouasie-Nouvelle-Guinée, a montré une association entre l'IFN- γ produite par ces cellules et la protection contre l'infection à *P. falciparum* à forte charge parasitaire (D'Ombrain et al., 2008), et des pourcentages plus élevés de ces cellules ont récemment été associés à la protection contre une ré-infection à Plasmodium falciparum chez les personnes recevant un vaccin expérimental à base de sporozoïte atténué (Ishizuka et al., 2016).

Alors que les lymphocytes T V γ 9V δ 2 peuvent jouer un rôle dans l'élimination des parasites, leur production de cytokines pro-inflammatoires a été impliquée dans la pathogenèse des symptômes graves du paludisme (Stanisic et al., 2014). Ainsi, la réduction de l'activation excessive des lymphocytes T V γ 9V δ 2 peut être nécessaire pour le développement d'une immunité clinique contre le paludisme. En accord avec cette hypothèse, différentes études ont montré que le paludisme répété (notamment en région endémique) était associé à une perte de cellules T V γ 9V δ 2+ dans le sang périphérique, à une diminution de leur prolifération et de la production de cytokines par ces cellules en réponse à la stimulation par les antigènes palustres et à une surexpression de nombreux gènes associés à la modulation de la réponse immunitaire (Farrington et al., 2016; Jagannathan et al., 2014). De plus, la perte et le dysfonctionnement des lymphocytes T V γ 9V δ 2+ ont été associés à une probabilité plus faible de développer des symptômes lors d'une infection ultérieure (Jagannathan et al., 2014). Une récente étude conduite en Ouganda, a montré qu'une production plus élevée de cytokines pro-inflammatoires par les cellule T V γ 9V δ 2 est associée à une protection contre une infection à *P. falciparum* ultérieure, mais aussi à une probabilité accrue de développer des symptômes une fois l'individu infecté. Les lymphocytes T V γ 9V δ 2 semble donc jouer un rôle dans la prévention de l'infection palustre chez les enfants vivant en milieu endémique; la perte progressive et le dysfonctionnement de ces cellules pourrait représenter un mécanisme de tolérance à la maladie qui contribue au développement de l'immunité clinique contre le paludisme (Jagannathan et al., 2017). Une autre étude a, quant à elle, mis en évidence une prolifération de cellules T γ δ non-V γ 9 qui produit de l'IL-10 chez les patients prémunisés (Taniguchi et al., 2017).

Enfin, une étude récente propose un rôle de cellules présentatrice de l'antigène. Dans cette étude, les lymphocytes T V γ 9V δ 2 d'individus infectés par *P. falciparum* ont montré un phénotype de CPA partiel (forte expression de HLA-DR et CD86), phénotype qu'elles acquièrent après stimulation par des globules rouges infectés. De plus, elle montre que, suite à une stimulation par les globules rouges infectés, les cellules T V γ 9V δ 2 pulsées par une protéine virale sont capables de présenter l'antigène aux T CD8+ spécifiques qui produisent de l'IFN- γ (Howard et al., 2017).

4. LES CELLULES NKT

Les lymphocytes NKT constituent un groupe de cellules hétérogènes possédant à la fois des marqueurs de lymphocytes T (TCR et CD3) et de lymphocytes NK (CD161) et qui sont restreints au CD1d, une molécule présentatrice d'antigènes glycolipidiques analogue à la molécule de CMH de classe I. Bien que, ces cellules ne représente que 0.2 % des lymphocytes T du sang périphérique, elles semblent impliquée dans l'immunité protectrice contre l'infection palustre et plus particulièrement contre les stades hépatiques. En effet, une étude conduite chez le modèle murin a montré que l'administration du glycolipide α -galactosylcéramide (α -GalCer) à des souris infectées par *P. yoelii* et *P. berghei* inhibe le développement des parasites intra-hépatocytaires prévenant ainsi de l'apparition des stades sanguins asexués de l'infection ([Gonzalez-Aseguinolaza et al., 2000](#)). En outre, d'autres travaux ont rapporté qu'une expansion des cellules NKT activées au niveau du foie était observée suite à l'infection des souris par des sporozoïtes de *P. yoelii*. Ces travaux ont également montré *in vitro* que ces cellules inhibent la croissance parasitaire intra-hépatocytaire, partiellement médiée par l'INF- γ ([Pied et al., 2000](#)). Néanmoins, une étude *in vivo* récente de la même équipe a montré que des souris déficientes en CD1d ne présentent aucune différence de charge parasitaire dans le foie ou le sang après infection à *P. yoelii* en comparaison aux souris témoins, suggérant que les cellules NKT joueraient un rôle mineur dans le contrôle de l'infection palustre ([Soulard et al., 2007](#)).

D'autre part, l'hypothèse du rôle des cellules NKT en tant que cellules T auxiliaires médiant la production d'anticorps antipaludiques par les cellules B a aussi été avancée mais reste controversée. En effet, une étude a démontré que la réponse humorale dirigée contre la protéine circumsporozoïte est fortement diminuée chez les souris déficiente en CD1d ([Schofield et al., 1999](#)). De plus, cette étude a montré que le GPI purifié à partir des stades sanguins de *Plasmodium falciparum* était capable de stimuler *in vitro* des cellules NKT murines, suggérant que les cellules NKT agissent comme cellules T auxiliaires pour faciliter la production d'anticorps anti-protéine circumsporozoïte par les cellules B *in vivo*. Une autre étude a montré que lorsque les cellules NKT CD1d dépendantes sont activées pendant les stades sanguins asexués de l'infection à *P. berghei*, elles favorisent une réponse de type Th2 qui est corrélée avec

l'amélioration des réponses anticorps spécifiques de *P. berghei*, en particulier celles contre la protéine MSP-1 à ancre GPI. Dans cette étude, il convient de noter que la production d'anticorps contre la protéine MSP-1 à ancre GPI n'a été significativement réduite chez les souris déficientes en CD1d que durant les premiers stades suivant l'immunisation, alors qu'aucune différence entre les souris CD1d déficientes et les souris sauvages n'a été observée lorsque la réponse aux anticorps anti-MSP-1 a été évaluée après une plus longue période d'infection (Hansen et al., 2003). Bien que le mécanisme précis soit inconnu, cette étude suggère le rôle des cellules NKT en tant que cellules T auxiliaires médiant la production d'anticorps antipaludiques par les cellules B. Le rôle des cellules NKT en tant que cellules T auxiliaires dans la réponse humorale antipaludique *in vivo* a toutefois été remis en question par deux autres études indépendantes (Bruña-Romero & Rodriguez, 2001; Molano et al., 2000). En utilisant des souris CD1d déficientes et des souris sauvages contrôles, ces deux groupes de recherche ont comparé les taux de réponse humorale contre la protéine CSP lors de l'immunisation avec des sporozoïtes de *P. yoelii* ou *P. berghei*, respectivement. Ainsi, il a été démontré que le niveau de réponse humorale et le niveau d'immunité protectrice contre le paludisme n'était pas affecté chez les souris déficiente en CD1d quel que soit le contexte génétique des souris, c'est-à-dire BALB/c et C57BL/6. Ces deux dernières études semblent indiquer que les cellules NKT n'ont pas un rôle essentiel dans la réponse médiée par les anticorps.

À ce jour, l'implication des cellules NKT dans l'immunité anti-palustre n'a pas encore été démontré chez l'homme.

5. LES CELLULES NK

Les lymphocytes Natural Killer sont des cellules essentielles à l'établissement d'une réponse immunitaire innée précoce. A ce jour, leur implication dans le contrôle des cancers et des infections virales de par la production de cytokines pro-inflammatoires et la destruction de cellules dysfonctionnelles ou infectées par une activité cytotoxique est bien établie. Mais de récentes études tendent à leur attribuer un rôle majeur dans la lutte contre un plus grand nombre de pathogènes, y compris les parasites intracellulaires tels que *Plasmodium*.

Ainsi, leur localisation dans le sang périphérique, la rate, le foie et la moëlle osseuse semble idéale pour permettre une interaction avec les cellules infectées des stades hépatiques et érythrocytaires de l'infection palustre (Grégoire et al., 2007).

La réponse cytokinique

L'implication des cellules NK dans le contrôle de l'infection palustre de par la production de cytokine a été démontrée dans de nombreuses études chez l'homme et les modèles murins. Ainsi, il a été démontré chez la souris que la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ et le TNF α par les cellules NK du sang périphérique, de la rate et du foie augmente significativement en réponse aux stades érythrocytaires et hépatiques de *Plasmodium yoelii* (De Souza, Williamson, Otani, & Playfair, 1997; Stegmann, De Souza, & Riley, 2015), ainsi qu'au stade érythrocytaire de *P. chabaudi* (De Souza et al., 1997; Mohan, Moulin, & Stevenson, 1997). Il a également été démontré que la déplétion expérimentale de cellules NK chez des souris infectées par *P. yoelii* ou *P. chabaudi* entraîne une diminution de la production d'IFN- γ en corrélation avec une augmentation de la parasitémie (Choudhury, Sheikh, Bancroft, Katz, & De Souza, 2000; Mohan et al., 1997), ce qui suggère que les cellules NK contribuent significativement à la production précoce de cytokines pro-inflammatoires qui est associée à une meilleure issue clinique.

Dans les stades pré-érythrocytaires de l'infection, l'IFN- γ produit par les cellules NK hépatiques en prolifération inhibe la croissance des schizontes hépatiques (J. L. Miller, Sack, Baldwin, Vaughan, & Kappe, 2014; Roland et al., 2006). Les interférons de type I (IFN- α et - β) produits par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) sont considérés comme d'importants moteurs de l'activation des cellules NK hépatiques (J. L. Miller et al., 2014; Nguyen et al., 2002; Yu et al., 2016) car les souris déficientes en IFNAR (récepteur IFN- α/β exprimé à la surface des NK) n'ont pas été capables de réduire la charge parasitaire du stade hépatique dans les infections non létale à *P. yoelii* (J. L. Miller et al., 2014). Cependant, certaines études suggèrent que les lymphocytes NKT et/ou les lymphocytes T $\gamma\delta$ peuvent jouer un rôle plus important que les lymphocytes NK dans la réponse inflammatoire précoce médiée par les cytokines (J. L. Miller et al., 2014; Weidanz et al., 2010). La divergence de ces résultats

pourrait être due en partie à la variabilité des temps d'infection analysés, ainsi qu'aux différences entre les souches de *Plasmodium* et les modèles murins utilisés. En effet, dans un système dynamique comme le système immunitaire, avec des niveaux élevés de redondance (types cellulaires différents sécrétant les mêmes cytokines), il est probable que plus d'un type de cellule ou mécanisme de protection contribue à l'issue de l'infection.

L'activation des cellules NK au cours de l'infection palustre a elle aussi été étudiée par de nombreuses études chez l'homme et les différents modèles murins. Ainsi, le rôle de l'IL-15 dans l'activation des cellules NK a été démontré dans un modèle de paludisme à *P. chabaudi*. Deux études comparant des souris C57Bl/6 déficientes en IL12 ou IL15 avec des souris sauvages suite à l'infection à *P. chabaudi*, ont indiquée que l'IL-15 sécrétée par les cellules dendritiques en association avec l'IL12 augmente la production d'IFN- γ par les cellules NK (Ing, Gros, & Stevenson, 2005; Ing & Stevenson, 2009). Ces résultats ont été corroborées par des études in vitro sur les NK humaines montrant que l'IL-15 est une cytokine essentielle dans l'activation des cellules NK (Lucas, Schachterle, Oberle, Aichele, & Diefenbach, 2007), que les combinaisons de cytokines sont nécessaires pour stimuler la production d'IFN- γ par les cellules NK (Aste-Amezaga, D'Andrea, Kubin, & Trinchieri, 1994; Fehniger et al., 1999; Gramzinski et al., 2001), et que la perte d'IL-12 se traduit par une diminution des réponses IFN- γ , une parasitémie plus élevée et des réponses médiées par les anticorps anti-parasitaires moins efficaces (M. M. Stevenson, Tam, Wolf, & Sher, 1995; Zhong Su & Stevenson, 2002). Parallèlement, la signalisation IL-2 favoriserait l'activation complète des cellules NK (Horowitz, Behrens, Okell, Fooks, & Riley, 2010). En effet, une étude récente conduite sur le modèle murin de l'infection palustre à *P. yoelii* a montré une corrélation entre l'expression de CD25, la sous-unité du récepteur à haute affinité de l'IL2, et la production d'IFN- γ par les NK d'une part et l'issue clinique de l'infection d'autre part. L'expression du CD25 serait principalement médiée par l'IL-18 et renforcée par l'IL-12 (Stegmann et al., 2015). La corrélation entre l'expression du CD25 et la production d'IFN- γ renforce l'hypothèse du rôle de l'IL-2 sécrétée par les lymphocytes T dans le maintien ou la stimulation des réponses NK chez les souris (Stegmann et al., 2015). La capacité de répondre aux signaux médiés par les lymphocytes T peut également indiquer un rôle pour les cellules NK au-delà de l'infection précoce.

L'activation optimale des cellules NK chez l'homme nécessite également une stimulation par l'IL-12 et IL-18 produites par les cellules accessoires myéloïdes (Jagannathan et al., 2014), l'IL-2 produite par les cellules T CD4+ mémoire (Horowitz et al., 2010) et des contacts physiques entre les cellules NK et les cellules accessoires myéloïdes (Baratin et al., 2005, 2007; Newman, Korbel, Hafalla, & Riley, 2006). La nécessité d'une stimulation par l'IL-12 et l'IL-2 pour une production optimale d'IFN- γ par les cellules NK peut expliquer l'association entre la production de ces cytokines et l'amélioration de l'issue clinique dans les infections humaines à *P. falciparum* (Prakash et al., 2006).

Dans les modèles murins d'infections palustres graves, une production excessive d'IFN- γ ou de TNF peut conduire à une immunopathologie sévère (G. E. Grau et al., 1989; Hansen et al., 2014; Lepenies et al., 2007; Villegas-Mendez et al., 2012) suggérant que, bien que les cellules NK soient bénéfiques dans les réponses immunitaires précoces du paludisme, elles peuvent contribuer aux effets néfastes d'une inflammation systémique excessive (Hansen et al., 2014). Certaines études ont d'ailleurs suggéré que les cellules NK pourraient recruter des lymphocytes T dans le cerveau pendant les infections murines à *P. berghei* et donc contribuer au développement du paludisme cérébral expérimental (Hansen et al., 2014; Hansen, Bernard, Nie, & Schofield, 2007). Différentes études chez l'homme suggèrent, elles aussi, que la production d'IFN- γ , de TNF α et d'IL-12 par les PBMCs est associée à des densités parasitaires plus faibles et à des concentrations d'hémoglobine plus élevées, mais aussi à une incidence élevée d'épisodes fébriles chez les enfants ghanéens (Dodoo et al., 2002; Rhee, Akanmori, Waterfall, & Riley, 2001). Des taux élevés de TNF α ont également été associés au paludisme grave chez les enfants de cette région (Boeuf et al., 2012). Ces études indiquent que les réponses pro-inflammatoires excessives sont corrélées avec des symptômes cliniques plus graves, mais une meilleure clairance parasitaire.

Les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β ont donc été montrées comme régulatrices de la réponse immunitaire pro-inflammatoire dans les stades plus tardifs de l'infection palustre, permettant de contrebalancer les effets pathologiques des cytokines inflammatoires (C. Li, Corraliza, & Langhorne, 1999; Ching Li, Sanni, Omer, Riley, & Langhorne, 2003; Omer & Riley, 1998). Ainsi, une étude a montré que la neutralisation du TGF- β s'avère létale dans une infection à

P. chabaudi chabaudi normalement non mortelle (Omer & Riley, 1998), et l'absence d'IL-10 chez les souris IL-10^{-/-} entraîne une augmentation de la production d'IFN- γ , de TNF α et d'IL-12 et exacerbe la pathologie et la mortalité (Couper et al., 2008; C. Li et al., 1999). L'IL-10 et le TGF- β semblent présenter un certain chevauchement de fonctions et peuvent individuellement diminuer les réponses pro-inflammatoires (Ching Li et al., 2003), bien que les deux soient suggérées dans la régulation de l'activation des macrophages (Bogdan, Paik, Vodovotz, & Nathan, 1992; Couper et al., 2008). Cependant, une surexpression de TGF- β ou d'IL-10 très tôt dans l'infection inhibe la réponse pro-inflammatoire et empêche la clairance parasitaire (Couper et al., 2008). En effet, une première étude a révélé qu'une production excessive de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β et l'IL-10 au début de l'infection est liée à une capacité réduite à contrôler la croissance parasitaire (Walther et al., 2005), et une seconde étude a indiqué que ces cytokines régulatrices étaient sur-exprimées chez les patients atteints de paludisme cérébral (Prakash et al., 2006). Il est intéressant de noter, cependant, que cette étude a également trouvé une association entre des niveaux élevés de TNF α mais pas d'IFN- γ et le développement du paludisme cérébral (Prakash et al., 2006). Ce dernier résultat suggère qu'une classification des cytokines comme étant simplement pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires, peut sembler simpliste dans l'étude de la réponse immunitaire antipaludique. Bien que l'immunité clinique contre le paludisme chez la souris et chez l'homme semble exiger un équilibre précis entre les réponses pro-inflammatoires précoces nécessaires à éliminer les parasites et les réponses anti-inflammatoires régulatrices nécessaires pour prévenir la pathologie immunitaire, de plus en plus de données suggèrent que l'équilibre entre les deux est très complexe. De toute évidence, la réponse immunitaire dirigée contre l'infection palustre exige une investigation beaucoup plus complexe que de simplement indiquer quelles cytokines sont produites et lesquelles ne le sont pas. Les sources cellulaires spécifiques de cytokines, la quantité produite et le moment de leur production par rapport au cours de l'infection semblent être des déterminants clés de l'issue clinique de l'infection palustre.

Ainsi, l'avènement des techniques de coloration intracellulaire des cytokines et l'analyse cellulaire de la production de cytokines par cytométrie de flux ont

révélé une redondance considérable dans les sources cellulaires de l'IFN- γ , les cellules T $\gamma\delta$ et les cellules NK produisant également l'IFN- γ en réponse aux érythrocytes infectés (Artavanis-Tsakonas et al., 2003; Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002; Waterfall, Black, & Riley, 1998). Cependant, bien que de nombreuses populations de lymphocytes différentes soient capables de produire de l'IFN- γ , leur contribution relative dans la réponse globale d'IFN- γ varie selon les stades de l'infection. Ainsi, la proportion exacte de la réponse des cytokines attribuée aux cellules NK ou aux cellules T semble varier en fonction du temps examiné (McCall & Sauerwein, 2010) et, par conséquent, les incohérences dans les résultats des différentes études portant sur les principales sources d'IFN- γ parmi les PBMCs exposés aux érythrocytes infectés reflètent probablement des conditions expérimentales différentes et des différences dans les temps choisis pour l'analyse. Très peu d'études ont tenté d'établir une gamme complète des sources cellulaires de l'IFN- γ au cours de l'infection (King & Lamb, 2015).

La réponse cytotoxique

En plus du rôle bien établi des cellules NK dans la production de cytokines en réponse aux érythrocytes infectés, de nombreux travaux ont constaté une activité cytotoxique de ces cellules leur permettant de tuer directement les cellules infectées par *Plasmodium*. Ainsi, des granzymes cytotoxiques ont été détectées au cours des stades sanguins de l'infection, dans le plasma de volontaires infectés expérimentalement par le paludisme ainsi que dans le plasma d'enfants camerounais naturellement infectés (Hermsen et al., 2003). Ces résultats suggèrent que les érythrocytes infectés pourraient être la cible d'une activité cytotoxique in vivo des cellules NK ou des cellules T CD8+. Il a également été démontré que les cellules NK issues du foie de souris C57Bl/6 infectées par *P. yoelii* présentent, in vitro, une activité cytotoxique contre les cellules hépatiques infectées.

Les cellules NK ont également été observées à plusieurs reprises formant des interactions stables avec des érythrocytes infectés in vitro (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002; Baratin et al., 2005; Korb, Newman, Almeida, Davis, & Riley, 2005). En effet, une première étude conduite en 2005 a permis de démontrer que les cellules NK92 immortalisées étaient capables de se lier sélectivement aux

érythrocytes infectés, mais pas aux érythrocytes non infectés (Baratin et al., 2005). Cette interaction a également été observée entre des NK isolés de donneurs sains et des globules rouges infectés par *P. falciparum* (par différents groupes (Artavanis-Tsakonas et al., 2003; Korbel et al., 2005; Talman, Blagborough, & Sinden, 2010).

Bien qu'il y ait de plus en plus de résultats indiquant une élimination cytotoxique des cellules parasitées par les cellules NK ainsi que des interactions directes et fonctionnelles entre elles, les récepteurs et ligands à l'origine de ces interactions sont controversés.

La molécule d'origine parasitaire qui a été largement impliquée dans les interactions entre les érythrocytes infectés et d'autres cellules hôtes (et qui est donc un candidat de choix pour la médiation des interactions entre les cellules NK et les érythrocytes infectés) est PfEMP1. Les variants polymorphes de PfEMP1 présentent des avidités différentes pour différents ligands tels que ICAM, CSA, CD36 (J. D. Smith, 2014)... Une étude a montré que l'interaction de PfEMP1 au CSA est à l'origine de la liaison des érythrocytes infectés aux cellules NK92, mais que cette interaction n'est pas nécessaire pour l'activation subséquente des cellules NK (Baratin et al., 2007). En 2007, une étude conduite par Mavoungou *et al.* a suggéré que le domaine DBL1-a de PfEMP1 se lie au récepteur activateur NKp30 exprimé à la surface des NK, entraînant une libération de perforine et de granzyme B à l'origine de la lyse des globules rouges infectés (Mavoungou, Held, Mewono, & Kremsner, 2007). Mais, une autre étude s'étant intéressée aux marqueurs de cytotoxicité des cellules NK après 6 heures de co-culture avec des globules rouges infectés exprimant ou non le PfEMP1, a montré que PfEMP1 n'est pas nécessaire à l'activation de la cytotoxicité des cellules NK, les cellules dépourvues de PfEMP1 ayant été en mesure de déclencher la cytotoxicité NK. Cette étude a avancé que dans des conditions naturelles la densité de PfEMP1 à la surface des globules rouges n'est pas suffisante pour activer la cytotoxicité des cellules NK en comparaison à la forte concentration de DBL1-a utilisé dans les travaux de Mavoungou (D'Ombraïn et al., 2007). Néanmoins, au vu de l'hétérogénéité qualitative et quantitative de PfEMP1 à la surface des globules rouges infectés, une investigation plus fine, prenant en compte ces facteurs semble nécessaire.

Par ailleurs, d'autres ligands et récepteurs ont été proposés comme étant impliqués dans l'activation d'une réponse cytotoxique des cellules NK, dont la protéine de choc thermique Hsp70, qui est un ligand de stress (Böttger, Multhoff, Kun, & Esen, 2012) ou LFA-1, molécule essentielle pour un contact stable avec les cellules cibles (Qingfeng Chen et al., 2014; Urlaub, Höfer, Müller, & Watzl, 2017). Comme la stimulation d'au moins deux récepteurs activateurs est nécessaire à une cytotoxicité et une libération de cytokines optimale des cellules NK (Bryceson, March, Ljunggren, & Long, 2006), effet synergique également suggéré par Mavoungou *et al.* (Mavoungou et al., 2007) dans un contexte palustre, ces résultats ne semblent pas contradictoires. Cependant, des études supplémentaires semblent là encore nécessaires pour caractériser les acteurs et mécanismes de cette activation synergique.

Diversité des réponses NK et récepteurs KIR

La diversité des réponses NK observée entre les individus provient probablement de plusieurs facteurs, y compris l'intensité des signaux cytokiniques et co-stimulateurs provenant des monocytes/macrophages et cellules dendritiques (Newman et al., 2006), l'état de maturation des cellules NK en fonction de l'âge et de l'infection par le cytomégalovirus humain (Nielsen, White, Goodier, & Riley, 2013) ou encore des différences quantitatives et qualitatives, déterminées génétiquement, des récepteurs activateurs et inhibiteurs des NK; ces derniers étant responsables du seuil d'activation des NK (Höglund & Brodin, 2010). Parmi ces différences, la diversité génétique des KIR a été montrée comme pouvant contribuer à l'hétérogénéité de la réponse aux érythrocytes infectés.

Le locus KIR contient des gènes codant à la fois pour les KIR activateurs et inhibiteurs, (Fig. 18) et l'hétérogénéité du contenu des gènes combinée à un polymorphisme allélique conduit à une grande diversité haplotypique et à des populations de cellules NK très diverses au sein d'un même individu (Horowitz et al., 2013). Deux grandes familles d'haplotypes KIR ont été décrites en fonction du contenu en gènes : l'haplotype A caractérisé principalement par des gènes codant des récepteurs inhibiteurs avec KIR2DS4 comme seul récepteur activateur possible, et l'haplotype B caractérisé par des combinaisons plus

équilibrées de récepteurs inhibiteurs et activateurs ([Middleton & Gonzelez, 2010](#); [Parham, Norman, Abi-Rached, & Guethlein, 2012](#)).

Ainsi, différentes études génétiques ont pu mettre en évidence une implication de ces récepteurs dans la production de cytokines par les cellules NK ou encore les différentes formes de paludisme. Par exemple, les NK d'individus hétérozygotes AB cultivés en présence de globules rouges infectés ont montré une production d'IFN-g accrue par rapport au individus homozygotes AA ou BB ([Korbel et al., 2009](#)). De même, une étude conduite au Nigeria a suggérée que l'hétérozygotie AB est protectrice face à l'infection palustre, les enfants porteurs de l'haplotype c-AB2/t-AA étant plus susceptibles de présenter une parasitémie asymptomatiques que des infections palustres symptomatiques simples ou graves ([Olaniyan et al., 2014](#)).

Néanmoins, dans une population gambienne, il a été suggéré qu'un haplotype AA KIR peut être protecteur pendant l'infection palustre et qu'une combinaison de KIRs activateurs est associé à une mortalité plus élevée ([Yindom et al., 2012](#)); ceci peut suggérer que les réponses cellulaires NK contribuent à des réponses inflammatoires exacerbées qui sont associées à une maladie grave, soit parce qu'elles expriment un KIR activant particulier qui reconnaît un ligand, encore inconnu, sur les érythrocytes infectés, soit parce-que la balance de KIR activateurs et inhibiteurs exprimés par les NK porteurs de l'haplotype B diminue leur seuil d'activation ([Ivarsson, Michaëlsson, & Fauriat, 2014](#)). A ce jour, la plus grande étude d'association génétique entre les KIR et la susceptibilité au paludisme, a été menée en Thaïlande, et a rapporté que le KIR2DL3 (inhibiteur) en association avec son ligand HLA-C1 est associé à un risque accru de paludisme cérébral par rapport au paludisme non compliqué et que cette combinaison de KIR2DL3/HLA-C1 est significativement moins fréquente dans les zones d'endémie palustre que prévu; les auteurs ont proposé que ce soit une preuve de sélection naturelle ([Hirayasu et al., 2012](#)). Cependant, des études plus vastes sur les KIR tenant compte du contexte génétique de la population et de la diversité allélique des ces récepteurs et de leur ligand HLA de classe I sont nécessaires pour déterminer s'ils influencent réellement la progression de la maladie.

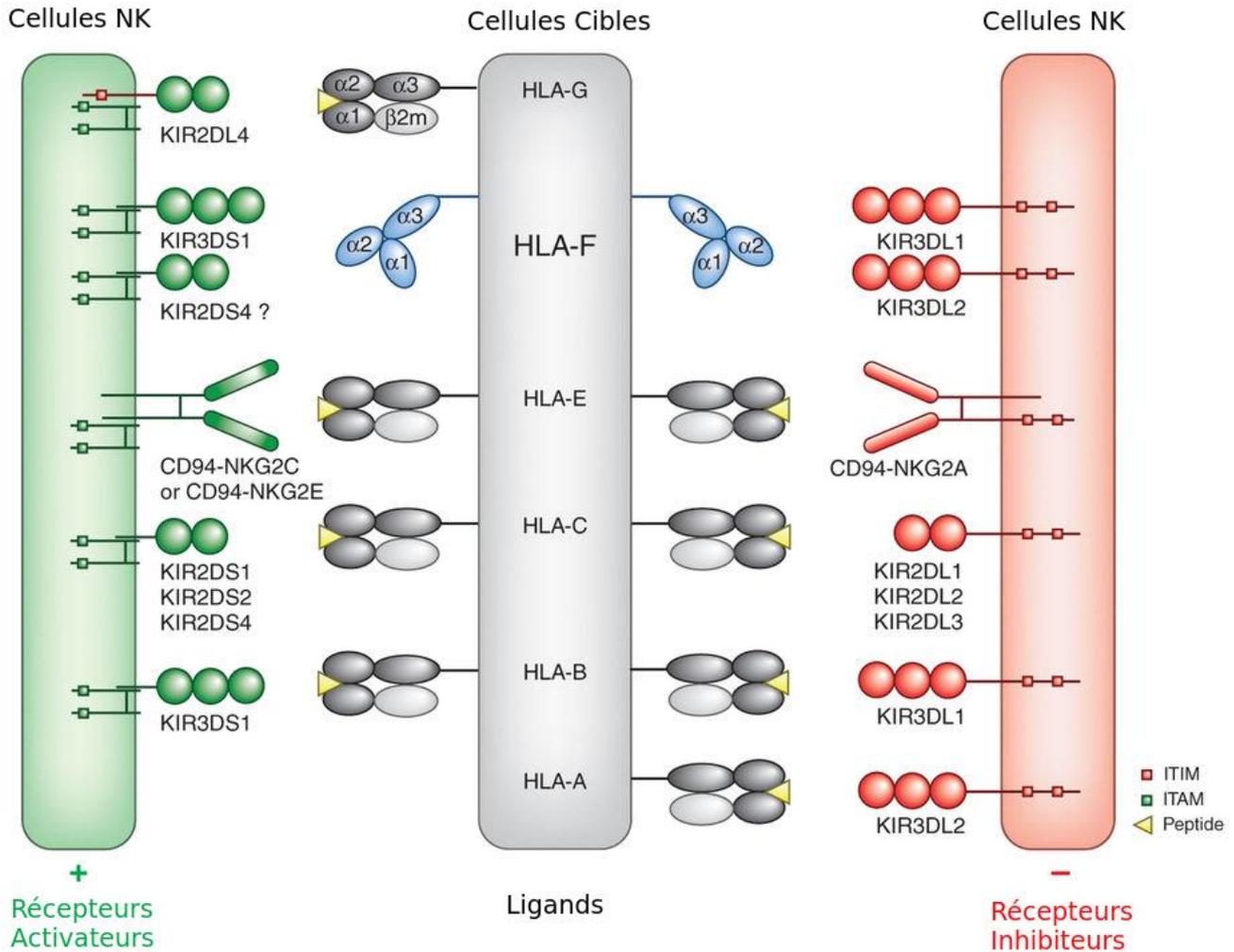


Fig.18. Signaux activateurs et inhibiteurs liés aux interactions KIR-HLA. Les molécules classiques CMH de classe I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) et les molécules non classiques de CMH de classe I (HLA-E, HLA-F et HLA-G) sont reconnues par des récepteurs activateurs (verts) et des récepteurs inhibiteurs (rouges) exprimés sur les cellules NK (seuls les récepteurs humains du CMH de classe I exprimés sur les cellules NK sont présentés ici). Les récepteurs KIR inhibiteurs possèdent un long domaine intracytoplasmique avec un motif ITIM (Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif). La phosphorylation de ce motif, suite à la reconnaissance des molécules CMH de classe I par le récepteur, conduit à l'activation de phosphatases intracellulaires qui transmettent des signaux inhibiteurs et empêchent l'activation des cellules NK. Les récepteurs KIR activateurs sont associés à la membrane par une molécule adaptatrice qui porte un motif ITAM (Immunoreceptor tyrosine based activation motif) dans son domaine intracytoplasmique. Lorsque le récepteur reconnaît son ligand spécifique sur la cellule cible, le motif ITAM est phosphorylé, ce qui déclenche une activation en cascade de phosphorylases kinases intracellulaires, conduisant à l'activation des NK. L'inclusion d'un "L" ou d'un "S" dans la désignation indique si le KIR est long (inhibiteur) ou court (activation), respectivement. Les KIR abritent deux (KIR2D) ou trois (KIR3D) domaines extracytoplasmiques de type immunoglobuline. KIR3DL2 reconnaît quelques molécules HLA-A (comme HLA-A3 et HLA-A11), et KIR3DL1 reconnaît certaines molécules HLA-B (celles avec un motif Bw4). La spécificité des membres de la famille KIR2DL pour le HLA-C est largement déterminée par l'acide aminé en position 80. Les molécules HLA-C du groupe 1 (HLA-C1) ont une asparagine en position 80, ce qui confère une reconnaissance par KIR2DL2 et KIR2DL3, tandis que les molécules HLA-C du groupe 2 (HLA-C2), présentant une lysine en position 80, sont reconnues par KIR2DL1. Dans la plupart des cas, l'affinité des récepteurs activateurs pour le ligand de classe I du CMH est inférieure à l'affinité des isoformes inhibiteurs pour le même ligand. Une exception notable est la haute affinité de KIR3DS1 pour les conformères ouverts de HLA-F. Adapté de (Vély, Golub, & Vivier, 2016)

GÉNÉTIQUE HUMAINE ET RÉSISTANCE AU PALUDISME

Les parasites palustres ont exercé une forte pression sélective sur le génome humain dans les zones endémiques, conduisant à l'accumulation progressive de variations génétiques touchant les globules rouges mais aussi le système immunitaire. La persistance, parmi ces variations, de mutations responsables de maladies à transmission mendélienne (telles que les hémoglobinopathies ou encore la déficience en glucose-6-phosphate déshydrogénase), en dépit des conséquences néfastes pour les individus homozygotes, font état de cette force de sélection exercée par le paludisme ([Kwiatkowski, 2005](#)).

La première démonstration du contrôle génétique de la susceptibilité au paludisme grave a été fournie par la découverte de la mutation de l'*HbS* ([Gilles et al., 1967](#); [A. V. Hill et al., 1991](#)) qui confère à l'hôte, une protection contre la maladie. Plusieurs études génétiques ont par la suite identifié d'autres gènes conférant une résistance au paludisme, bien que les résultats obtenus soient parfois contradictoires, notamment en raison des différences entre les populations étudiées (Encadré 2). L'exemple le plus connu de résultats contradictoires concerne le gène du *TNF* pour lequel des associations significatives opposées ou l'absence d'association ont été obtenues avec les différents phénotypes du paludisme selon les populations étudiées (Tableau 3). Dans la suite de ce chapitre, l'accent sera mis sur les études de liaison et d'association génétiques ayant mis en évidence des gènes impliqués à la fois dans la fonction des cellules Natural Killer et les différentes manifestations cliniques de la maladie. L'intérêt se portera en premier lieu aux régions génétiques identifiées par des approches pangénomiques, puis aux gènes et variants de ces régions impliqués dans les fonctions des cellules NK et associés aux différentes formes de la maladie. Enfin, certains gènes non retrouvés dans ces régions mais dont les résultats d'association sont robustes et/ou fonctionnellement pertinents dans ces cellules seront abordés. Par ailleurs, une liste exhaustive des gènes associés aux fonctions des globules rouges, à la réponse immunitaire de l'hôte et aux mécanismes de cytoadhérence impliqués dans le paludisme ont été révisés dans ([de Mendonça, Goncalves, & Barral-Netto, 2012](#)).

Région génomique	Liaison génétique			Association génétique			Variant impliqué	
	Références	Phénotype	Population	Approche	Références	Phénotype		Population
Signaux de cytokines								
IL-2	4q27	Non rapporté Sakuntabhai et al., 2008	Non rapporté Sénégal	Non rapporté GWL	Non rapporté Zhang et al., 2010	Non rapporté SA	Non rapporté Kenya	Non rapporté Gène-candidat rs2243140/rs22431348
IL-12A	5q33	AS Garcia et al., 1998 Parasiétémie Rihet et al., 1998 Parasiétémie Flori et al., 2003	Non rapporté Cameroun Burkina Faso (urbaine) Burkina Faso (rurale)	Région Candidate Région Candidate Région Candidate				
IL-12B	5q33	AS Sakuntabhai et al., 2008 Parasiétémie Garcia et al., 1998 Parasiétémie Rihet et al., 1998 Parasiétémie Flori et al., 2003 IL12/Parasiétémie Barbier et al., 2008	Non rapporté Cameroun Burkina Faso (urbaine) Burkina Faso (rurale) Burkina Faso (urbaine)	Région Candidate Région Candidate Région Candidate Gene-candidat	Phawong et al., 2010 Marquet et al., 2008 Morahan et al., 2002 Naka et al., 2009	SM CM CM CM	Myanmar Thaïlande Tanzanie Thaïlande	Gène-candidat rs17860508/rs3212227 Gène-candidat rs17860508 Gène-candidat rs17860508 Réplication
IL-18	11q23	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté Anyona et al., 2011	SA	Kenya	Gène-candidat rs187238/rs1946518 haplotype
IL-15	4q31	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
IFNA	9p21	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
IFNB	9p21	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
IL-21	4q27	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
Recepteurs de cytokines								
IL2RA	10p15	Timmann 2007	MM Ghana	GWL	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
IL2RB	22q12	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
IL2RG	Xq13	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
IL12RB1	19p13	Brisebarre 2014	MM Burkina Faso	GWL	Zhang et al., 2010	SA/Parasiétémie	Kenya	Gène-candidat rs429774/rs383483
IL12RB2	1p31	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
IL-18R	2q12	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
IL15R	10p15	Timmann 2007	MM Ghana	GWL	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
IFNAR	21q22	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Aucan et al., 2003	SM/CM	Gambie	Gène-candidat IFNAR1 17470 / IFNAR1 L168V diplotype
IFNBR	21q22	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Khor et al., 2007	SM	Gambie/Kenya/Vietnam	Réplication IFNAR1-576
IL21R	16p12	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
Récepteur ADCC								
FCGR1IA/CD16	1q23	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
Cytotoxicité								
perforine	10q22	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
granzyme A	5q11	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
granzyme B	14q12	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
Fas (sur la cible)	10q23	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Schuldt et al., 2011	SM	Ghana	Gène-candidat Fas-436A
Fas ligand (sur NK)	1q24	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
TRAIL-récepteur A-D	8p21	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
TRAIL	3q26	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté
NKR								
KIR2DL5A	19p13	Brisebarre 2014	MM Burkina Faso	GWL	Non rapporté	SM/SM+MM AS/MM/SM	Gambie Nigéria	Gène-candidat AA Gène-candidat A/B
Haplotypes KIR	19q13	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Yindom et al., 2012 Olanvan et al., 2014	CM	Thaïlande	KIR2DL3-HLAC1
KIR/HLA	19q13.4/ 6p21-p22	Non rapporté	Non rapporté	Non rapporté	Hirayashu et al., 2012			

MM= Paludisme Non Compliqué
 SM= Paludisme Grave
 CM= Neupaludisme
 SA= Anémie Sévère
 AS= Parasiétémie asymptomatique
 RD= Détréresse respiratoire
 PS= Paludisme symptomatique

en vert : liaison suggestive
 en rouge : liaison significative

Tableau 3 : Gènes/molécules impliquées dans la fonction des NK retrouvés dans les études de liaison et d'association génétique

A. GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA RÉSISTANCE AUX ACCÈS PALUSTRES SIMPLES

Les accès simple de paludisme sont diagnostiqués sur la base de la parasitémie à *P. falciparum*, de la fièvre et des symptômes cliniques (maux de tête, douleurs, vomissements ou diarrhée). Une étude longitudinale sur des jumeaux gambiens a montré que la susceptibilité aux épisodes de fièvre palustre était déterminée au moins en partie par des facteurs génétiques (A. P. Jepson et al., 1995). Ainsi, l'étude de liaison pangénomique, ayant détecté une liaison suggestive entre le locus 6p21-p23 et la parasitémie asymptomatique, a montré que ce même locus est significativement associé aux accès palustres simples dans la population burkinabé (Brisebarre et al., 2014), confirmant ainsi les résultats de deux précédentes études région-candidates indépendantes ayant identifié cette région en Gambie et dans la zone urbaine du Burkina Faso (L. Flori et al., 2003; A. Jepson et al., 1997). Cinq gènes sont retrouvés sous le pic de liaison parmi lesquels le *TNF* et le *NCR3*. Le *NCR3* est un gène essentiel dans la biologie des NK. En effet, ce gène code pour un récepteur activateur exprimé à la surface des cellules NK. Or, comme indiqué précédemment pour les KIR, une balance fine des signaux activateurs et inhibiteurs détermine la réponse de ces cellules. Des recherches plus poussées sur ces deux gènes ont révélé que les polymorphismes du *TNF* (*TNF-1031*, *TNF-308*, *TNF851* et *TNF1304*) et du *NCR3* (*NCR3-412*) étaient associés à des épisodes non compliqués de paludisme (Delahaye, Barbier, Fumoux, & Rihet, 2007; L. Flori et al., 2005). D'autres études d'association ont suggéré que des polymorphismes du *TNF* (Tableau 3.1 et 3.2) étaient impliqués dans le paludisme, en particulier, la réinfection symptomatique à *P. falciparum*. En effet, une réinfection plus rapide chez les porteurs du *TNF-308A* a été rapporté dans une étude au Gabon et en Gambie (Meyer, May, Luty, Lell, & Kremsner, 2002; Stirnadel et al., 1999).

Une autre analyse de liaison à l'échelle du génome sur 68 familles recrutées dans les zones rurales du Ghana (Afrique de l'Ouest) a quant à elle détectée une liaison significative entre la susceptibilité au paludisme non compliqué et la région chromosomique 10p15 (Timmann et al., 2007). Cette région contient plusieurs gènes candidats fonctionnels impliqués dans la biologie des NK, dont

IL15RA (chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-15) et *IL2RA* (chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-2). Mais à ce jour, aucune étude n'a rapporté d'association entre ces gènes et les manifestations cliniques du paludisme.

B. GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE CONTRÔLE DE LA PARASITÉMIE

Plusieurs études ont souligné que le contrôle génétique de la parasitémie est complexe, impliquant plusieurs facteurs génétiques plutôt qu'un seul effet génétique majeur (Garcia, Cot, et al., 1998; Rihet, Abel, et al., 1998). De ce fait, une première étude de liaison pangénomique portant sur des phénotypes relatifs à la parasitémie, impliquant 190 familles nucléaires, a été conduite à Dielmo au Sénégal et a mis en évidence une liaison significative entre la région chromosomique 5q31-q33 et la densité parasitaire moyenne asymptomatique, répliquant ainsi le résultat de 3 précédentes études de liaison génétique indépendantes (d'approche région-candidate) (L. Flori et al., 2003; Garcia, Marquet, et al., 1998; Rihet, Traoré, et al., 1998; Sakuntabhai et al., 2008). En effet, au Cameroun, Garcia et ses collaborateurs avaient déjà détecté une liaison suggestive entre la région 5q31 et la parasitémie dans 9 familles nucléaires (Garcia, Marquet, et al., 1998), tandis qu'au Burkina Faso, une liaison et plusieurs associations significatives avaient été détectées dans des échantillons beaucoup plus importants de 34 et 84 familles nucléaires respectivement (L. Flori et al., 2003; Rihet, Traoré, et al., 1998). Ces résultats ont été reproduits également dans un modèle murin d'infection palustre à *Plasmodium chabaudi*, où un locus quantitatif de la résistance au paludisme a été cartographié dans des régions homologues de 5q31-q33 chez l'humain (Hernandez-Valladares, Rihet, ole-MoiYoi, & Iraqi, 2004). Cependant, aucun lien n'a été observé entre la région 5q31-q33 et la densité parasitaire d'une population sénégalaise, mais une association significative a été trouvée entre l'intensité de l'infection plasmodiale et un polymorphisme du gène *ARHGAP26* dans la région 5q31-q33 (Milet et al., 2010). Ce gène code pour une protéine impliquée dans la voie de transduction du signal d'intégrine (Ohta et al., 2016; Pasvolsky et al., 2008) et pourrait ainsi jouer un rôle dans la stabilité des interactions ICAM-1/LFA-1 entre les globules rouges infectés et les cellules NK.

Cette région est particulièrement intéressante, car elle contient différents gènes impliqués dans la fonction des cellules NK, dont l'*IL-12*, l'*IL13* et le *GM-CSF*. Mais à ce jour aucune étude n'a rapporté d'association entre ces gènes et la parasitémie. En revanche, plusieurs polymorphismes de l'*IL-12* et de l'*IL13* ont été retrouvés associés aux formes sévères du paludisme et seront discutés dans la section correspondante. Comme présenté dans la section consacrée aux NK, l'*IL-12* principalement produite par les cellules dendritiques et les macrophages, est indispensable à l'activation des cellules NK. De sorte que la perte d'*IL-12* se traduit par une diminution des réponses IFN- γ et une parasitémie plus élevée (M. M. Stevenson et al., 1995; Zhong Su & Stevenson, 2002). Néanmoins, malgré l'absence d'association, différents polymorphismes du gène *IL-12* (*IL-12pro*, *rs2288831*, *rs3213099*, *rs3181221*, *rs3213105*, *rs11574790*, *IL-12B 3'UTR*) ont été trouvés liés à la parasitémie dans la population urbaine de Bobo-Dioulasso au Burkina Faso (Barbier, Atkinson, Fumoux, & Rihet, 2008). L'absence d'association avec la parasitémie, dans le cas de l'*IL-12B* pourrait s'expliquer par l'existence de voies redondantes avec l'*IL-12*, comme la voie de l'*IL-18*, qui ne permettrait pas d'observer une association génétique ou encore l'hypothèse d'une interaction de l'*IL-12B* avec d'autres gènes liés à l'immunité; hypothèse renforcée par une évidence d'épistasie entre ce gène, d'autres gènes immunitaires et l'hémoglobine C (A. Atkinson, Barbier, Afridi, Fumoux, & Rihet, 2011).

Une liaison suggestive entre la parasitémie asymptomatique et le locus 6p21-p23, au niveau de la région du CMH, a été détectée dans une étude pangénomique récente menée auprès de 63 familles du district urbain Logoforouso et de 55 autres familles vivant dans la zone rurale de Bobo Dioulasso (Burkina Faso)(Brisebarre et al., 2014). Parmi les gènes d'intérêt présents sous le pic de liaison, le gène du *TNF* a été associé à la parasitémie symptomatique et asymptomatique, et plus précisément les polymorphismes *TNF-1031*, *TNF-308*, *TNF-238*, *TNF1304* et *TNF851*. En effet, une étude d'association conduite là aussi dans une population urbaine burkinabé a mis en évidence une association significative entre les polymorphismes *TNF-238*, *TNF1304* et *TNF851* et la parasitémie maximale symptomatique (L. Flori et al., 2005). En Inde, ce sont les variants *TNF-1031C* et certains haplotypes *TNF-1031/-857/-308/-238* (C-C-G-G et C-C-G-A) qui sont significativement plus

fréquents chez les individus présentant une parasitémie élevée (Basu et al., 2010). Enfin, dans une étude conduite au Kenya sur la prématurité, la mortalité infantile et la morbidité palustre, le polymorphisme *TNF-308* est associé à une forte densité parasitaire (Aidoo et al., 2001). Bien que les polymorphismes retrouvés dans les différentes études ne soient pas identiques, très probablement en raison, de l'hétérogénéité des populations et phénotypes, l'ensemble de ses résultats suggère un rôle central du *TNF* dans le contrôle de la parasitémie. Les cellules NK, et plus particulièrement les CD56bright, sécrètent du TNF- α après stimulation entre autre par d'autres cytokines telles que l'IL-12 et l'IL-2. Or, comme il a été discuté dans le chapitre immunité de ce manuscrit, il existe une dualité dans les effets du TNF sur le paludisme : un effet protecteur dans les stades précoces de l'infection, directement par son action inflammatoire et par le recrutement et l'activation de cellules effectrices permettant de limiter la parasitémie (Bouharoun-Tayoun et al., 1995; Ferrante, Kumaratilake, Rzepczyk, & Dayer, 1990); mais aussi un effet délétère dans les stades chroniques, contribuant à l'immunopathogénèse des formes sévères.

Un autre gène important de cette région ayant été associé à la parasitémie dans une étude conduite au Ghana est le gène *HLA-B*, et plus particulièrement les polymorphismes *HLA-A*01*, *HLA-B*35:01* et *HLA-B*53:01* (Yamazaki et al., 2011). Les molécules HLA-B sont les ligands des récepteurs KIR exprimés à la surface des cellules NK. Ces récepteurs KIR font partie d'un réseau de récepteurs permettent au NK de détecter leurs cibles cellulaires tout en épargnant les cellules normales. Il s'agit notamment des récepteurs inhibiteurs, activateurs, d'adhésion et des récepteurs des cytokines. L'intégration de ces signaux détermine si une cellule NK est activée ou non (Fig. 19) (Vivier, Ugolini, Blaise, Chabannon, & Brossay, 2012). D'autres approches gène-candidat ont d'ailleurs permis d'identifier des haplotypes *KIR* associés à une protection face à l'infection palustre, notamment une étude conduite au Nigeria qui a montré que les enfants porteurs du gène *c-AB2/t-AA* sont plus susceptibles de présenter une parasitémie asymptomatiques que des infections palustres symptomatiques simples ou graves (Olaniyan et al., 2014). Malheureusement, à ce jour aucune étude pangénomique et très peu d'étude gène-candidat se sont intéressés aux associations de couples *KIR/HLA* à des phénotypes palustres.

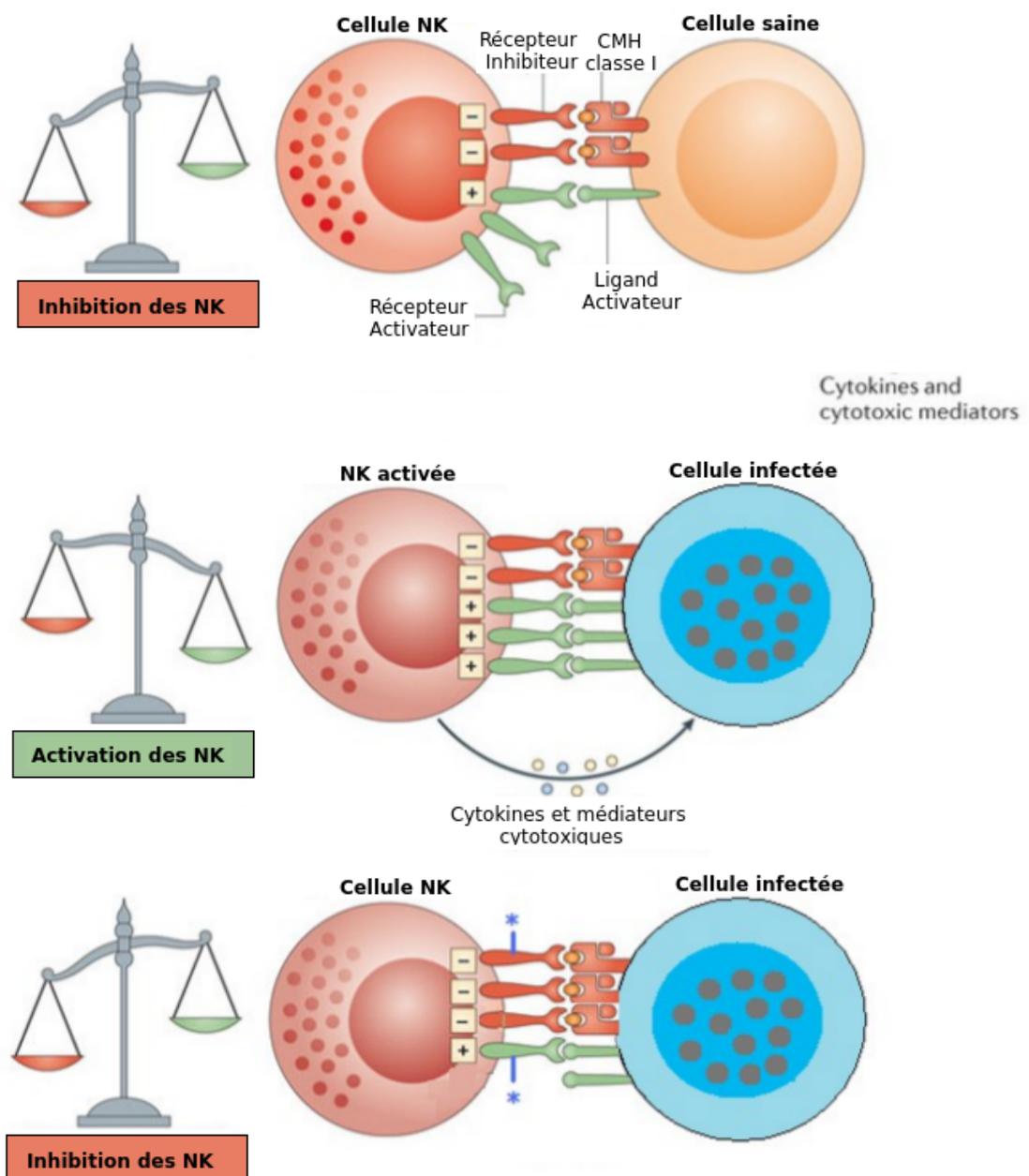


Fig. 19. Mécanismes moléculaires de reconnaissance de cellules pathologiques par les cellules NK. L'activation des cellules NK est le résultat de l'intégration de différents signaux activateurs (+) et inhibiteurs (-). A. Les cellules saines expriment des niveaux normaux de molécules du CMH de classe I qui les protègent de la lyse par les cellules NK (interaction avec les récepteurs KIR inhibiteurs). B. Différents stress cellulaires (dont l'infection par *Plasmodium*) peuvent induire une réduction de l'expression de certaines molécules du CMH ainsi qu'une augmentation considérable de l'expression de ligands pour des récepteurs activateurs NK. Ces mécanismes permettent la reconnaissance spécifique et l'élimination des cellules cibles infectées par les cellules NK. C. Des polymorphismes dans les gènes codant les récepteurs activateurs ou inhibiteurs peut entraîner une reconnaissance altérée par ces récepteurs, une absence d'activation des cellules NK et l'incapacité pour ces cellules d'éliminer les cellules parasitées. Adapté de (Vivier et al., 2012)

C. GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA RÉSISTANCE AUX FORMES SÉVÈRES DU PALUDISME

La plupart des études génétiques se sont concentrées sur les phénotypes du paludisme sévère, y compris le paludisme cérébral, l'anémie sévère et la détresse respiratoire, qui sont souvent mortels. Peu d'étude d'association à l'échelle du génome ont été conduites afin de mettre en évidence des régions et polymorphismes d'intérêt dans le cas de l'infection palustre grave ; et celles qui ont été conduites n'ont pas été en mesure de répliquer des variants admis comme influençant l'évolution de la maladie. En effet, la première étude de ce type sur le paludisme grave a été réalisée par Jallow et ses collaborateurs ([Jallow et al., 2009](#)), qui ont génotypé 500 000 SNP dans une cohorte initiale de 2500 enfants gambiens, puis ont réalisé une étude de réplication sur 3400 enfants. Étonnamment, cette étude n'a pas identifié de nouveaux gènes, mais a simplement confirmé l'association de la mutation HbS avec la protection contre le paludisme grave. Elle n'a pas non plus identifié de gènes impliqués dans la biologie du NK ni d'autres variants bien connus, notamment ceux impliqués dans la fonction des érythrocytes, tels que le groupe *ABO*, *G6PD*. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat décevant (Encadré 2).

La seconde étude d'association pangénomique, conduite dans une population Ghanéenne comptabilisant 1325 cas de paludisme grave (anémie sévère ou paludisme cérébral) et 828 témoins ([Timmann et al., 2012](#)), a identifié deux nouveaux gènes associés au paludisme sévère : *ATP2B4* et *MARVELD3*, sur les chromosomes 1q32 et 16q22.2, respectivement. Les résultats de cette étude ont également confirmé des rapports antérieurs sur les effets protecteurs des caractères drépanocytaires et du groupe sanguin O. Une analyse de réplication a été réalisée pour 1320 cas supplémentaires et 2222 témoins de la même population. Tous ces résultats, à l'exception de ceux du gène *MARVELD3*, ont été répliqués ($P < 0,05$).

Une vaste étude multicentrique cas-témoins sur le paludisme grave a récemment été menée sur 11 890 cas et 17 441 témoins provenant de 12 sites en Afrique, Asie et Océanie afin d'évaluer la contribution des gènes précédemment identifiés comme associés au paludisme grave ([Malaria Genomic Epidemiology Network & Malaria Genomic Epidemiology Network, 2014](#)). Un cadre statistique bayésien a

été utilisé pour l'analyse, afin de surmonter le problème de l'hétérogénéité des différentes populations étudiées. Au total, 55 SNP ont été évalués dans 27 régions génétiques. De fortes preuves d'association ($P < 10^{-4}$) ont été obtenues pour cinq des gènes étudiés (*ABO*, *ATP2B4*, *CD40L*, *G6PD* et *HBB*), et aucune interaction n'a été détectée entre ces gènes ([Malaria Genomic Epidemiology Network & Malaria Genomic Epidemiology Network, 2014](#)). Parmi ces gènes, le *CD40L* montre un intérêt fonctionnel dans les Natural Killer. Des études gène-candidat conduites en Gambie, Tanzanie et en Inde (récemment), avaient déjà pu pointer plusieurs associations significatives entre trois polymorphismes du *CD40L* (dont *CD40L-726* retrouvé deux fois) et différentes formes du paludisme sévère, y compris l'anémie sévère et la détresse respiratoire ([Manjurano et al., 2012](#); [Purohit et al., 2017](#); [Sabeti et al., 2002](#)). Le *CD40L* est un membre de la famille du TNF. Bien que la signalisation *CD40L* sur les lymphocytes T se liant au *CD40* sur les lymphocytes B dans la formation des centres germinatifs, l'hypermutation somatique et la commutation de classe soit le rôle le plus important de cette molécule, elle est également une molécule de co-stimulation exprimée à la surface des NK suite à leur activation et a été montré comme jouant un rôle important dans l'activation des macrophages dans le sepsis ([Scott et al., 2004](#)), mais aussi dans l'activation des lymphocytes B ([Blanca, Bere, Young, & Ortaldo, 2001](#)). Néanmoins, le rôle du *CD40L* à la surface des NK n'a pas été démontré à ce jour dans le cas du paludisme. Et dans l'étude multicentrique, l'association entre le *CD40L* et la protection détectée pour l'ensemble de la population étudiée n'a pas été trouvée de façon constante lorsque les différents sites ont été examinés séparément. Cette constatation suggère que les études génétiques sur le paludisme grave sont plus complexes qu'on ne le pensait et qu'il est difficile de reproduire les résultats antérieurs, même si l'on utilise des méthodes statistiques qui tiennent compte de l'hétérogénéité d'une population à l'autre. Une autre GWAS multicentrique comprenant 5633 enfants atteints de paludisme grave et 5919 témoins provenant de la Gambie, du Kenya et du Malawi a été réalisée en génotypant 2,5 millions de SNP et en imputant 10 millions de SNP, avec des approches statistiques appropriées utilisées pour tenir compte de l'hétérogénéité entre les populations ([Malaria Genomic Epidemiology Network, Band, Rockett, Spencer, & Kwiatkowski, 2015](#)). Cette étude a identifié un nouveau locus proche du gène

FREM3 et un amas de trois gènes glycophorine (*GYPE*, *GYPB* et *GYP A*) et a confirmé l'association avec les gènes *HBB*, *ABO* et *ATP2B4* (Malaria Genomic Epidemiology Network et al., 2015). Mais là encore, les polymorphismes associés aux formes sévères du paludisme, trouvés dans des études antérieures n'ont pas tous été retrouvés, montrant ainsi que la réalisation de telles études dans les populations africaines reste très difficile.

Plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la fonction des NK se sont avérés être associés au développement de formes palustres graves dans différentes populations par des approches gènes-candidats. Parmi ceux-ci, on retrouve certains gènes qui avaient été associés à la parasitémie comme le *TNF*, avec principalement les variants *TNF-308G* retrouvés associés à la résistance au paludisme sévère au Sri Lanka (Wattavidanage et al., 1999), au neuropaludisme et à l'anémie sévère en Gambie (McGuire et al., 1999; McGuire, Hill, Allsopp, Greenwood, & Kwiatkowski, 1994) (bien que ce soit le variant A qui soit retrouvé associé à la résistance au paludisme sévère au Vietnam) ; les variants *TNF-238G* et *TNF-238A* retrouvés associés avec l'anémie sévère (Clark et al., 2009) et le neuropaludisme (J. C. Knight et al., 1999) respectivement et les variants *TNF-1031T/TNF-863A/TNF-857T* retrouvés associés à la résistance au neuropaludisme dans une population thaïlandaise (H. Hananantachai et al., 2007). On retrouve aussi des couples KIR/HLA de classe I et plus précisément *KIR2DL3-HLAC1* associé à la susceptibilité au neuropaludisme en Thaïlande (Hirayasu et al., 2012). D'autres gènes impliqués dans l'activation des NK, et plus précisément *IL-12A*, *IL-12B* et *IL-18* ont été associés à différents phénotypes sévères. *IL-12A* avec 2 variants et *IL-18* avec un SNP sont associés à l'anémie sévère dans une population kényane (Anyona et al., 2011; Zhang et al., 2010) et *IL-12B* avec principalement le polymorphisme *rs17860508* est associé au neuropaludisme à Myanmar, en Thaïlande et en Tanzanie (Marquet et al., 2008; Morahan et al., 2002; Naka et al., 2009, 2009; Phawong et al., 2010). Enfin, un dernier gène d'intérêt impliqué dans l'activation des NK est *CISH* dont les variants *CISH-639/CISH-292/CISH1320/CISH-3415* ont été associés au paludisme sévère. En effet, ce gène appartient à la famille des suppresseurs de la signalisation de cytokines. Il contrôle non seulement la signalisation de l'IL-2 en interagissant avec son récepteur IL2R β mais aussi celle des cytokines de la voie

de signalisation JAK-STAT5 comme l'érythropoïétine, la prolactine et le récepteur de l'IL3.

Le rôle majeur des interférons de type I (IFN- α et - β) dans l'activation des cellules NK hépatiques (J. L. Miller et al., 2014; Nguyen et al., 2002; Yu et al., 2016) ayant été montré par l'incapacité des souris déficientes en IFNAR (récepteur IFN- α/β) à réduire la charge parasitaire du stade hépatique dans les infections non létales à *P. yoelii* (J. L. Miller et al., 2014), il n'est pas surprenant de retrouver des polymorphismes associés au paludisme sévère dans différentes population de Gambie, du Kenya et du Vietnam (Aucan et al., 2003; Khor et al., 2007). De même, au vu du rôle central dans la réponse immunitaire innée et adaptative de l'IFN- γ contre l'infection palustre, les cellules NK étant des producteurs majeurs de cette cytokine, il est étonnant de trouver peu d'étude rapportant une association avec des phénotypes palustres. En effet seul l'*IFNG-183* au Mali et l'*IFN5612*, l'*IFNG220* et l'*IFNG-1616* en Gambie ont été retrouvés associés au neuropaludisme (Cabantous et al., 2005; O. Koch et al., 2005).

Les cellules NK peuvent utiliser les voies perforine/granzyme B ou FasL pour médier la cytotoxicité (Eischen, Schilling, Lynch, Krammer, & Leibson, 1996; Kägi et al., 1994; Montel, Bochan, Hobbs, Lynch, & Brahmi, 1995; Trinchieri, 1989). La cytotoxicité à médiation FasL est spécifiquement dirigée contre les cellules cibles exprimant le récepteur Fas exprimé à la surface des cellules cibles. Une étude a démontré que FasL est surexprimée dans les cellules NK stimulées par les récepteurs activateurs 2B4 et LFA-1 (Chua, Serov, & Brahmi, 2004). Une autre étude ayant proposé LFA-1 comme impliqués dans l'activation d'une réponse cytotoxique des cellules NK (Qingfeng Chen et al., 2014), il est intéressant de retrouver des polymorphismes associés aux gènes *Fas* et *ICAM-1*, les interacteurs respectifs de FasL et LFA-1. En effet, *Fas-436A* a été associé à une augmentation de Fas et à la protection contre le paludisme sévère dans une étude conduite au Ghana (Schuldt et al., 2011). Les associations génétiques des variants d'*ICAM1* avec le paludisme grave ont souvent été contradictoires. Les premières études au Kenya (Fernandez-Reyes et al., 1997) et au Gabon (Kun et al., 1999) ont identifié des associations entre *rs5491* (*ICAM-1Kilifi*) et le paludisme; cependant, ces observations initiales n'ont pas été reproduites (Bellamy, Kwiatkowski, & Hill, 1998; Ndiaye et al., 2005; Ohashi et al., 2001), y compris dans une étude de grande envergure et bien étayée combinant trois

populations (Gambie, Kenya et Malawi) avec une analyse d'association familiale et cas-témoins (Fry et al., 2008). Dans la cohorte vietnamienne, *rs5491* a été exclu en raison du taux élevé d'échec du génotypage; cependant, cette étude a trouvé une association avec *rs5498* et le paludisme grave (Dunstan et al., 2012). Ce polymorphisme est également associé à un risque accru de paludisme grave au Nigeria (Amodu et al., 2005) et en Inde (Sinha et al., 2008).

Comme on peut le constater, la plupart des études visant à identifier des facteurs de résistance/susceptibilité au paludisme grave ont principalement fait appel à une stratégie cas/contrôle pour explorer des gènes candidats spécifiques suggérés par certains mécanismes physiopathologiques de cette pathologie. Seules quelques-unes des études réalisées se sont basées sur des approches d'analyses d'association familiale, éliminant ainsi le besoin de recruter des groupes témoins et évitant l'introduction d'un biais de sélection dû à la stratification de la population. Les études d'associations familiales ont nécessité des familles nucléaires, dont un enfant atteint et ses deux parents. Le recrutement de ces familles est plus difficile que la sélection de population cas-témoins et peut expliquer pourquoi peu d'études basées sur les associations familiales ont été menées jusqu'à présent sur le paludisme grave. De telles études génétiques nécessitent une définition précise du phénotype clinique, ce qui peut être difficile dans le cas du paludisme grave. Par conséquent, bon nombre des études ont probablement été réalisées avec des phénotypes hétérogènes, ce qui a limité le pouvoir de ces approches et a pu mener à des résultats incohérents.

Encadré 2

Analyse d'association et résultats contradictoires dans le cas du paludisme

Au cours des 50 dernières années, l'association possible de plusieurs gènes candidats à la malaria sévère a été étudiée en détail, mais les résultats obtenus étaient souvent contradictoires ou n'ont pas été associés. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces résultats incohérents: l'hétérogénéité du phénotype clinique d'une étude à l'autre peut avoir influé sur les résultats; la pression de sélection exercée sur le génome humain diffère probablement d'une population à l'autre, en raison des co-infections spécifiques observées dans chaque région ; les mutations rares de différents gènes d'une même voie pourraient être impliqués plutôt que des variants de quelques gènes ; l'existence d'interaction épistatiques, telles que celles décrites entre le variant commun de l'haptoglobine et l'alpha-thalassémie (S. H. Atkinson et al., 2014) ; l'existence d'autres gènes non encore identifiés ou évalués par des approches gènes candidats pourraient être impliqués.

Les analyses du déterminisme génétique des maladies complexes se sont rapidement accélérées ces dernières années, grâce au développement récent de technologies à haut débit. Ces technologies permettent aujourd'hui de réaliser des études d'association à l'échelle du génome (GWAS) pour identifier les gènes de susceptibilité sans qu'il soit nécessaire de formuler des hypothèses préalables sur la fonction des gènes. Ces approches font appel à des puces permettant d'analyser simultanément plusieurs milliers à plusieurs millions de SNP, ce qui nécessite cependant un grand nombre de sujets pour atteindre une puissance statistique suffisante. De plus, la pratique courante en matière d'études génétiques nécessite l'analyse de deux cohortes indépendantes : une cohorte de découverte pour identifier les régions chromosomiques intéressantes et une cohorte de réplification pour confirmer les résultats significatifs. Mais ce type d'étude présentent aussi des limitations, notamment dans les populations Africaines, pouvant conduire à des échecs, comme i) une hétérogénéité phénotypique considérable, avec des caractéristiques cliniques qui se chevauchent (dans le cas de l'étude conduite par Jallow et al (Jallow et al., 2009), 82 % des enfants atteints de paludisme grave avaient un neuropaludisme, 30 % souffraient d'anémie sévère et 11 % souffraient de détresse respiratoire) ; ii) une stratification considérable de la population ; des différences dans la structure de l'haplotype entre les différents groupes ethniques inclus dans ces études (il convient de noter l'impact de cette structure haplotypique aussi sur l'étape d'imputation (Y.-Y. Teo, Small, & Kwiatkowski, 2010) (Fig. 20, Fig. 21) ; iii) une faible efficacité de marquage des « tag-SNP » dans la population Africaine. En effet, ces SNP permettent, en théorie, d'analyser l'information génétique de plusieurs SNPs alentour grâce au déséquilibre de liaison. Cependant ces déséquilibres de liaison sont variables d'un continent, d'une population voir d'une ethnie à l'autre, en particulier dans les régions chromosomiques ayant subi une sélection positive récente au sein d'une population. Ainsi, les populations africaines ont généralement des déséquilibres de liaison plus faibles que les populations caucasiennes, sur lesquelles sont fondées le design de ces puces. Ces variations de déséquilibres de liaison peuvent provoquer un manque d'information génétique au niveau de certains locus. Une estimation a montré que dans le cadre d'une analyse à l'échelle du génome, 1,5 millions de SNPs devraient être génotypés dans une population africaine pour parvenir à la même puissance statistique qu'avec 0,6 millions de SNPs dans une population européenne (Y.-Y. Teo et al., 2010).

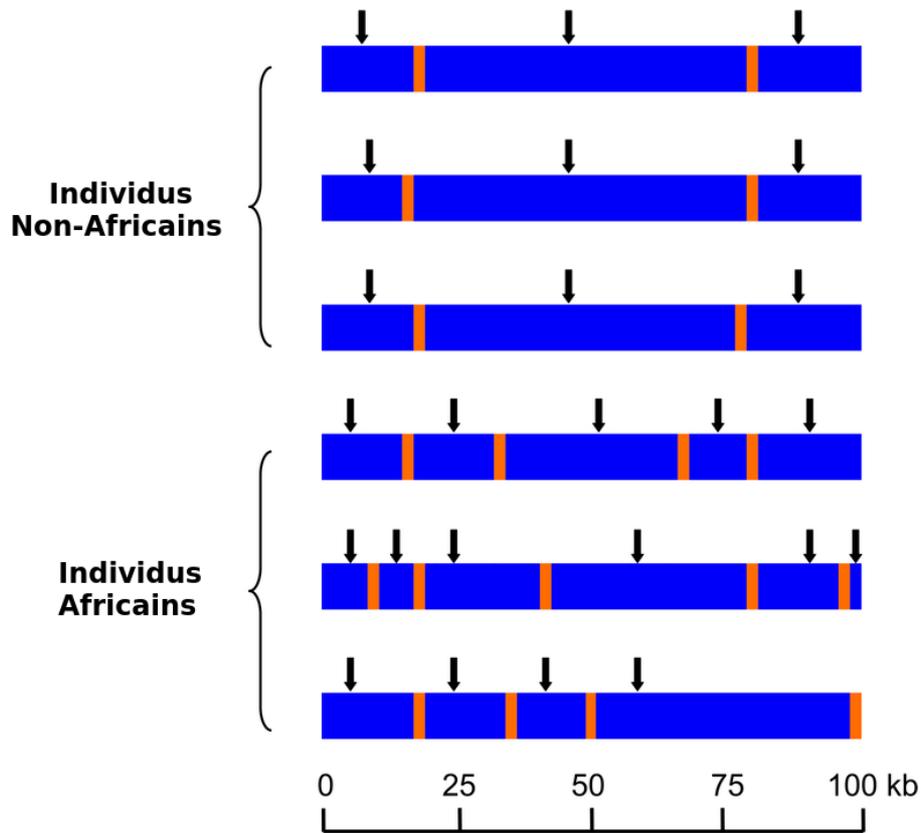
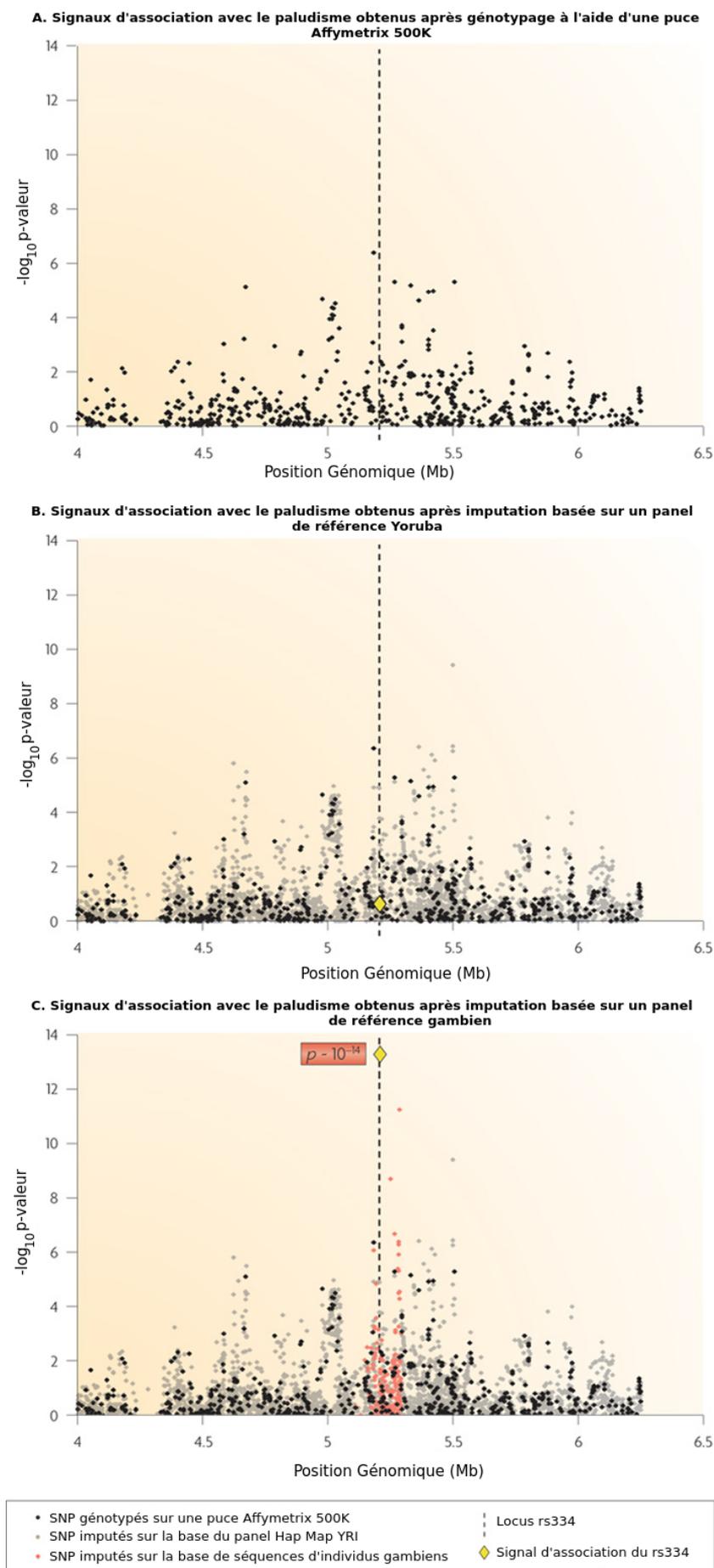


Fig. 20. Structure des haplotypes dans les populations africaines et non africaines. Plusieurs analyses ont indiqué que les blocs d'haplotype (où les SNP sont en fort déséquilibre de liaison fort) s'étendent sur de plus grandes distances génomiques et sont plus uniformes chez les non-Africains par rapport aux populations africaines. En outre, la taille et l'emplacement des blocs d'haplotype peuvent varier d'un échantillon africain à l'autre en raison de l'historique démographique distinct entre les populations des différentes régions géographiques d'Afrique. Les barres bleues représentent des blocs d'haplotype et les fines barres oranges désignent des régions de recombinaison. Les lignes verticales indiquent les SNP et les flèches verticales indiquent les SNP balises d'haplotype ("tag-SNP"). Comme les blocs d'haplotype sont plus variables chez les Africains que chez les non-Africains, l'identification des tag-SNPs dans divers groupes ethniques africains et une couverture plus dense de tag-SNP sont nécessaires pour détecter une association entre le(s) marqueur(s) et les loci de la maladie dans les études d'association. Adapté de (Campbell & Tishkoff, 2008)

Fig.21. Imputation et choix du panel de référence dans les population africaines à haute diversité haplotypique. L'imputation est un processus d'inférence statistique qui consiste à estimer le génotype le plus probable d'un individu à un endroit donné du génome, en se basant sur ce que l'on sait du génotype de cet individu à des positions proches (en déséquilibre de liaison) et sur un ensemble de données génotypique de référence dans la population générale. L'exactitude de l'imputation dépend de la pertinence de l'ensemble de données de référence. La figure montre des signaux d'association avec le paludisme grave à partir de SNP répartis sur une région du chromosome 11 d'environ 2,5 Mb. La ligne verticale en pointillés représente la position de *rs334* : ce SNP est connu pour coder le variant de l'hémoglobine S (*Hbs*) du gène de l'hémoglobine- β (*HBB*). **A.** Les SNP génotypés à l'aide de la puce de génotypage Affymetrix 500K (cercles noirs). **B.** SNP imputés en utilisant les données HapMap du peuple Yoruba à Ibadan, Nigeria (YRI) comme référence (cercles gris). Le SNP *rs334* est représenté par un diamant jaune. **C.** SNP imputés à partir de données basées sur les séquences génomiques de 62 individus gambiens (cercles oranges), y compris *rs334* (diamant jaune). Si nous ne savions pas que *rs334* était le variant causal, l'imputation basée sur les données de HapMap YRI aurait été trompeuse. Adapté de (Teo2010)



OBJECTIFS ET JUSTIFICATION DU PROJET

Objectifs généraux et justification du projet

Mon travail de thèse porte sur l'identification, la réplique et la caractérisation fonctionnelle de facteurs génétiques impliqués dans la résistance ou la susceptibilité aux différentes formes de paludisme chez l'homme en combinant des approches génétiques, bio-informatiques et moléculaires.

Une étude de liaison pangénomique conduite au Burkina Faso a mis en évidence une liaison significative à l'échelle du génome entre le locus 6p21-p23 (au niveau de la région du CMH de classe I) et les accès palustres simples (Brisebarre et al., 2014). Des études de liaison antérieures ayant aussi identifié la liaison de cette région avec le paludisme non compliqué dans d'autres populations africaines (Flori et al., 2003; Jepson et al., 1997), ce résultat confirme l'implication et le rôle majeur des gènes présents dans ce locus dans le contrôle de la résistance aux formes simples de la maladie. En plus de leur liaison, plusieurs polymorphismes au niveau des gènes retrouvés sous le pic de liaison ont été indépendamment associés à différents sous-phénotypes du paludisme simple dans la population burkinabé, notamment des variants localisés dans les promoteurs des gènes *TNF* et *NCR3* (Fig. 22) (Delahaye et al., 2007; L. Flori et al., 2005).

Afin de confirmer l'association de ces polymorphismes avec les phénotypes de parasitémie et d'accès palustres simples, nous avons conduit dans un premier temps une étude de réplique dans une population indépendante du Congo. La population d'étude se compose de 317 enfants âgés de moins de 10 ans, vivant en zone d'endémie péri-urbaine dans les districts de Kinsana, Mbouono et Ngoko au sud de Brazzaville (Fig. 23). Les individus ont été suivis passivement durant 1 an et la parasitémie a été évaluée uniquement lors des accès fébriles lorsque les patients se sont présentés à l'hôpital du district de Makélékélé, situé à environ 6 km de la zone d'étude. Il en résulte les phénotypes suivants : la parasitémie maximale symptomatique, le développement d'accès palustres non compliqués avec ou non un seuil de parasitémie > 5000 érythrocytes parasité/ μ l de sang, et le nombre d'accès fébriles. Au-delà de l'étude de réplique, la population congolaise présente un intérêt particulier, dans le sens où très peu de données

généétiques sont disponibles, notre étude permet ainsi de documenter la présence et le rôle de ces variants au sein de cette population.

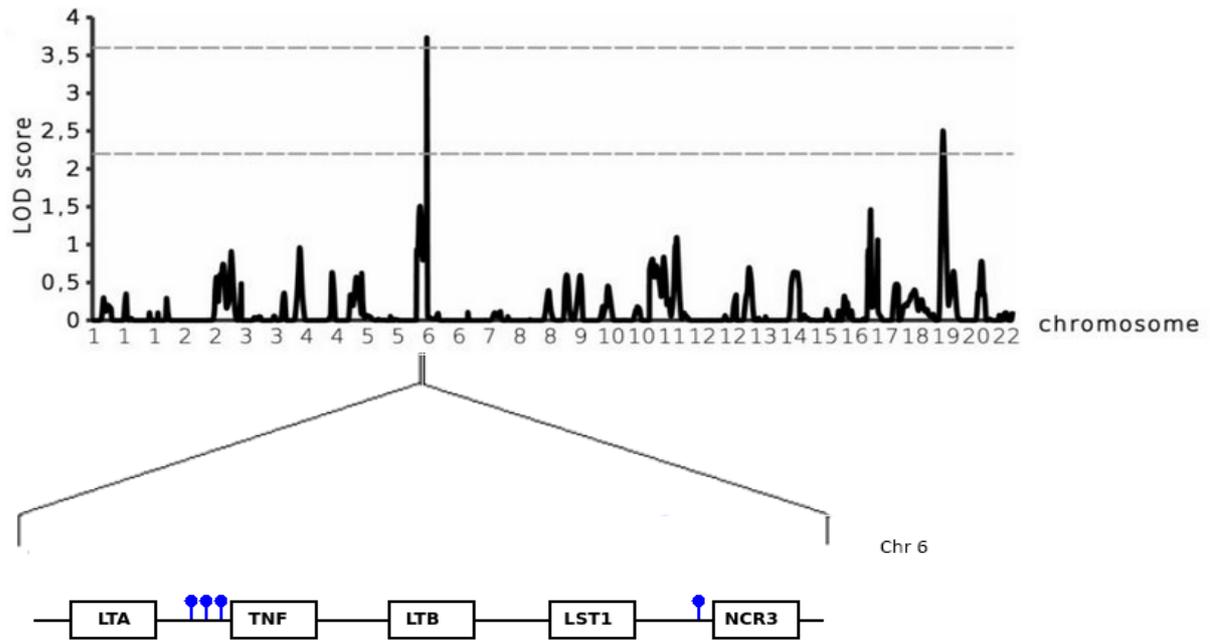


Fig. 22. Analyse de liaison pangénomique au Burkina Faso. L'analyse de liaison menée au Burkina Faso montre une liaison significative ($\text{LOD-score} > 3,6$) entre le locus 6p21-23 et la forme simple du paludisme. Sous le pic de liaison, cinq gènes sont retrouvés indépendamment associés à différents sous-phénotypes de la forme simple de la maladie. Parmi ceux-ci, on trouve le gène NCR3, dont le polymorphisme rs2736191 (indiqué en bleu) situé au niveau de son promoteur, est associé au paludisme dans cette population ; et le gène TNF, dont plusieurs polymorphismes localisé dans son promoteur, sont eux aussi associés au paludisme et à la parasitémie dans cette population. Adapté de (Brisebarre et al., 2014)

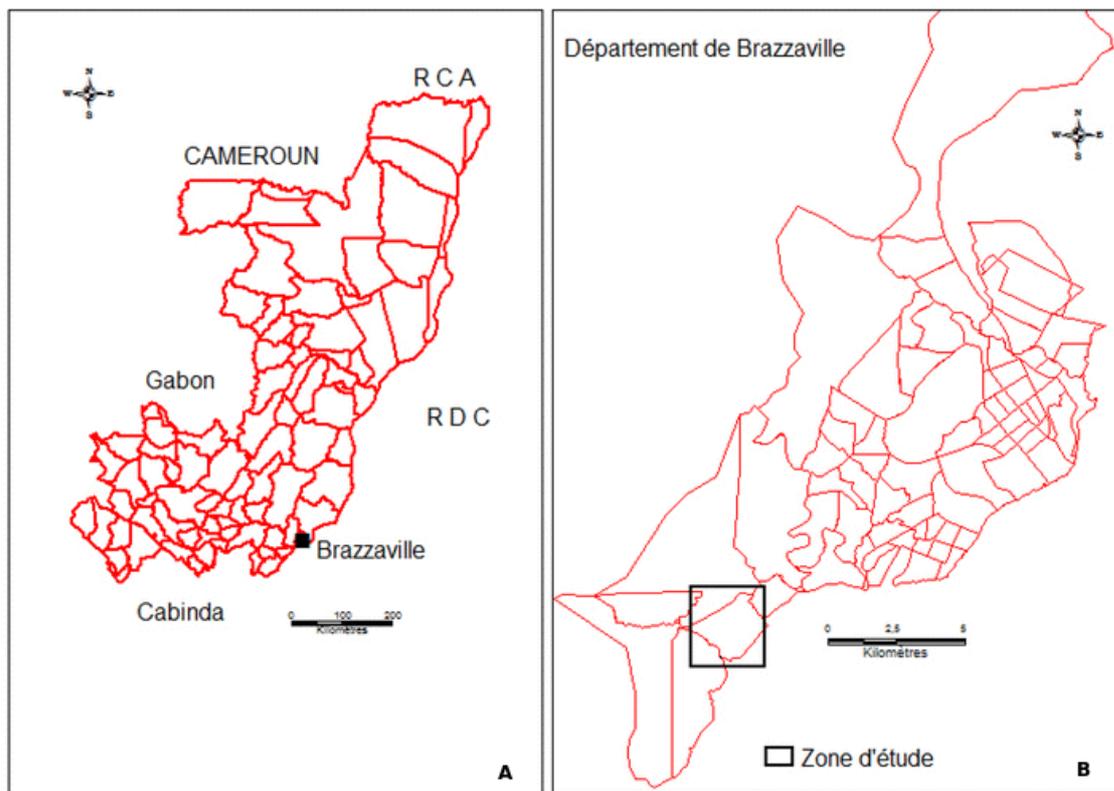


Fig. 23. Zone de recrutement de la population congolaise. La zone d'étude composée des districts de Kinsana, Mbouono et Ngoko au sud de Brazzaville est une zone où la transmission du paludisme a été décrite, en 1980, comme intense et pérenne, avec un taux d'inoculation entomologique de 200-1000 piqûres infectieuses/personne/an. Depuis, il n'y a pas eu de mise à jour avec des études entomologiques plus récentes. Les individus recrutés dans l'étude appartiennent à l'ethnie Bantu. (Ndounga et al., 2015)

Dans une seconde partie, dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'association de ces polymorphismes au paludisme, nous avons souhaité caractériser leur effet cis-régulateur par des approches fonctionnelles et bio-informatiques. Plusieurs études fonctionnelles du rôle des variants présents dans le promoteur du *TNF* ont été conduites auparavant (Bayley, de Rooij, van den Elsen, Huizinga, & Verweij, 2001; Fong, Siddiqui, & Mark, 1994; Kaluza et al., 2000; Kiss-Toth, Harlock, Lath, Quertermous, & Wilkinson, 2013), mais d'une part ces études ont fourni des résultats contradictoires et d'autre part elles ne se sont pas intéressées à l'effet conjoint de plusieurs polymorphismes sur l'expression du *TNF*; ce qui pourraient expliquer non seulement les contradictions des études fonctionnelles mais aussi génétiques. Ainsi, dans notre étude nous avons prêté une attention particulière à explorer la possibilité d'un effet synergique des polymorphismes retrouvés dans le promoteur du *TNF*. Concernant, le variant NCR3-412, aucune étude à ce jour n'a exploré son effet cis-régulateur potentiel. Ce gène code pour un récepteur activateur des cellules Natural Killer. Or, plusieurs études ont montré

l'importance de ces cellules dans le contrôle de l'infection palustre, par la production de cytokines pro-inflammatoires et une réponse cytotoxique. L'intégration de signaux activateurs et inhibiteurs médiant la réponse de ces cellules, un polymorphisme situé dans le promoteur d'un de ces récepteurs pourrait affecter cette réponse ; d'autant plus qu'une étude génétique conduite au laboratoire a mis en évidence une association de ce variant avec le paludisme non compliqué.

Enfin, il a été proposé que des gènes majeurs auraient un effet à la fois sur des phénotypes simples et sévères. Parmi ceux-ci, il est possible de citer le TNF qui, tout comme NCR3, se trouve au niveau du locus 6p21-23 liés aux formes simples du paludisme. Aux vues du rôle des cellules NK dans le paludisme, de l'association du NCR3-412 à la forme simple du paludisme au Burkina Faso et comme l'association de ce polymorphisme n'a jamais été exploré dans les phénotypes graves, nous nous sommes interrogés sur son rôle potentiel dans ce type d'accès dans une population du Sénégal. Le recrutement de la population d'étude a été effectué entre 2012 et 2015 dans deux sites sénégalais: à l'Hôpital Principal de Dakar et à l'hôpital régional de Tambacounda. Au total 189 individus ont été recrutés, dont 27 patients atteints de paludisme grave non cérébral, 86 patients atteints de neuropaludisme et 76 patients atteints de paludisme simple. La multiplicité des données cliniques pour les patients, telles que la numération plaquettaire, érythrocytaire, leucocytaire ou encore l'hématocrite, nous a permis d'analyser d'autres types de corrélation. De plus, il nous a été possible d'obtenir 12 échantillons d'individus non atteints, pour lesquelles une analyse de cytométrie nous a permis d'évaluer l'expression de NKp30 à la surface des NK chez ces individus. A notre connaissance, à ce jour aucune étude n'a évalué ce type de paramètre dans une population africaine.

Objectifs détaillés

Plus précisément, les objectifs de mon travail de thèse ont été de :

- Génotyper les variants TNF1304, TNF-308, TNF-238 et TNF-244 dans la population du Congo et tester leur association avec la parasitémie symptomatique maximale et les accès palustres simples. Puis de déterminer par des expériences de gel retard et de gène-rapporteur l'effet cis-régulateur simple ou combiné des différents polymorphismes du TNF. Enfin, d'identifier par des approches bio-informatiques les facteurs de la transcription candidats dont la fixation serait altérée en fonction des variants du TNF présentés.
- Génotyper le polymorphisme NCR3-412 dans la population du Congo et évaluer son association avec les accès palustres simples. Déterminer par des expériences de gel retard et de gène-rapporteur l'effet cis-régulateur de ce polymorphisme. Identifier par des approches bio-informatiques les facteurs de la transcription candidats dont la fixation serait altérée en fonction du variant NCR3-412 présenté. Vérifier la fixation de ces facteurs candidats à la séquence présentant le polymorphisme par des approches de pull-down/western-blot.
- Génotyper le polymorphisme NCR3-412 dans la population du Sénégal et tester son association avec les phénotypes graves du paludisme.

RÉSULTATS

RÉSULTAT 1 :

Thy Ngoc Nguyen, **Sabrina Baaklini**, Felix Koukouikila-Koussounda, Mathieu Ndounga, Magali Torres, Lydie Pradel, Francine Ntoumi, et Pascal Rihet :

« Association of a functional TNF variant with Plasmodium falciparum parasitaemia in a congolese » Genes and Immunity (2017).

Genes Immun. 2017 Jul 13. doi: 10.1038/gene.2017.13.

RÉSULTAT 2 :

Sabrina Baaklini, Sarwat Afridi, Thy Ngoc Nguyen, Felix Koukouikila-Koussounda, Mathieu Ndounga, Jean Imbert, Magali Torres, Lydie Pradel, Francine Ntoumi, et Pascal Rihet :

« Beyond genome-wide scan : association of a cis-regulatory NCR3 variant with mild malaria in a Congolese population » Plos one (2017).

PLoS ONE12(11): e0187818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187818>

RÉSULTAT 3 :

Alassane Thiam, **Sabrina Baaklini**, Babacar Mbengue, Magali Torres, Maryam Diarra, Mouhamadou Mansour Fall, Fatou Thiam, Alioune Dieye, et Pascal Rihet :

« A genetic association study of NCR3 with severe malaria in Senegalese patients » (2017). En préparation

Résultat 1 : Analyse d'association et caractérisation fonctionnelle de variants du TNF avec la parasitémie maximale symptomatique et les accès palustres simples dans une population du Congo

Au sein du laboratoire, différentes analyses de liaison région-candidate et pangénomique dans des populations urbaine et rurale du Burkina Faso ont mis en évidence une liaison génétique significative de la région p21-p23 du chromosome 6 avec le risque d'accès palustre simple, ainsi qu'avec la parasitémie maximale (Brisebarre et al., 2014; Laurence Flori et al., 2003). Parmi les 5 gènes localisés sous le pic de liaison, on retrouve le *TNF- α* qui au vu de son rôle essentiel dans le contrôle de la parasitémie mais aussi dans le développement d'une réponse inflammatoire excessive à l'origine de l'immunopathologie de l'infection palustre en font un candidat d'un grand intérêt pour les études génétiques.

En effet, de nombreux travaux se sont intéressés à l'association des différents variants du *TNF* avec principalement les formes sévères du paludisme (Aidoo et al., 2001; Clark et al., 2009; Gichohi-Wainaina et al., 2015; J. C. Knight et al., 1999; McGuire et al., 1994; Wattavidanage et al., 1999), mais aussi les formes non compliquées (L. Flori et al., 2005; Meyer et al., 2002). D'ailleurs différents polymorphismes situés dans le promoteur et les régions introniques du *TNF* ont été retrouvés associés à la parasitémie maximale (*TNF1304* et *TNF-238*) et aux accès palustres simples (*TNF1304* et *TNF-308*) dans la même population burkinabé que celle des différentes études de liaison conduites au laboratoire.

Peu de données génétiques en lien avec les maladies infectieuses sont disponibles dans la population congolaise (Koukouikila-Koussounda & Ntouni, 2016). Nous nous sommes donc intéressés à l'association de ces variants (*TNF-308*, *TNF-244*, *TNF-238* et *TNF1304*) avec les phénotypes de parasitémie maximale et d'accès palustre simple dans cette population. De plus, nous avons cherché à caractériser la fonction cis-régulatrice des variants associés, tout d'abord par des approches bio-informatiques afin d'évaluer le potentiel de ces variants à changer un site de fixation pour des facteurs de transcription et en déterminant les facteurs candidats potentiellement affectés. Enfin, par des

approches *in vitro* nous avons déterminé l'impact de ces variants sur la fixation de protéines nucléaires et l'expression du *TNF*.

Ainsi, à l'aide d'analyses univariées (dans le cas de la parasitémie maximale symptomatique) et multivariées (dans le cas des accès palustres) nous avons montré que les variants *TNF-308*, *TNF-244* et *TNF-238* sont associés à la parasitémie maximale symptomatique et que le variant *TNF-244* est associé au nombre d'accès palustre. Le variant *TNF-1304* n'a été retrouvé associé à aucun phénotype. Après correction des tests multiples, seul le *TNF-244* est retrouvé associé à la parasitémie maximale symptomatique. À ce jour, notre étude est la première à identifier une association entre ce polymorphisme et un phénotype palustre.

Les différentes approches bio-informatiques ont mis en évidence que *TNF-308*, *TNF-244* et *TNF-238* sont de bons SNP régulateurs candidats avec des scores GWAVA proche de 1. De plus, on les retrouve co-localisés avec les sites de fixation d'une quinzaine de facteur de transcription (pour les variants *TNF-244* et *TNF-238*), dont la plupart sont identiques, suggérant un effet conjoint des 2 SNP.

Les expériences de gène-rapporteur nous ont permis de confirmer les prédictions informatiques, à savoir que la présence du *TNF-244A* ou du *TNF-238A* altère significativement l'expression du gène. De plus, les expériences de gel retard ont montré que 4 complexes protéiques se fixent dans la région présentant les polymorphisme *TNF-244* et *TNF-238* ; 3 de ces complexes se fixent préférentiellement sur la séquence présentant la combinaison *TNF-244G/TNF-238G* de ces deux variants et un de ces complexes ne se fixe que sur la séquence présentant la combinaison *TNF-244G/TNF-238A*. Des analyses *in silico* complémentaires à l'aide de l'outil matrix-scan de la suite RSAT-tools ([Medina-Rivera et al., 2015](#)), nous ont permis d'identifier des facteurs candidats présentant des « altérations » de p-valeurs correspondant aux profils des protéines retardés dans les expériences de gel retard (Fig. 24).

Autrement dit, les facteurs STAT3 et ANT semblent correspondre aux 3 complexes se fixant préférentiellement sur la séquence présentant la combinaison *TNF-244G/TNF-238G* (avec la p-valeur la plus significative obtenue pour cette combinaison) ; les facteurs GFI1 et LFA1 semblent correspondre au complexe se fixant exclusivement à la séquence présentant la combinaison *TNF-*

244G/TNF-238A. (une p-valeur significative n'étant obtenue que pour la séquence présentant cette combinaison) (Fig. 25). Ces derniers résultats renforcent l'hypothèse d'une action synergique des 2 variants *TNF-244* et *TNF-238*. Néanmoins des expériences complémentaires sont nécessaires, d'une part pour confirmer l'association du *TNF-244* dans une population indépendante et d'autre part pour confirmer l'identité des facteurs candidats et l'effet synergique de ces 2 polymorphismes.

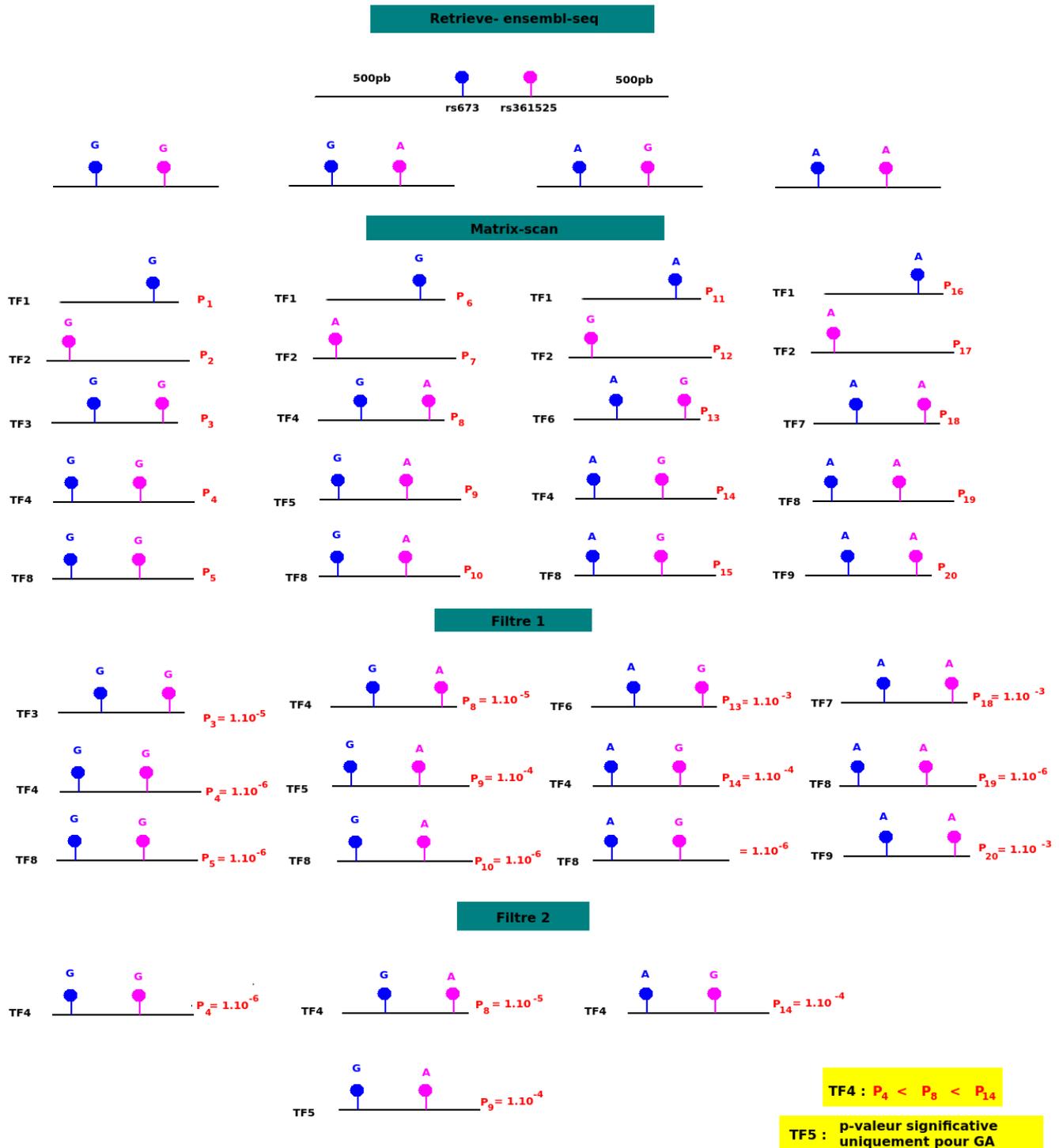


Fig. 24. Stratégie de recherche in silico de facteurs de transcription candidats. La base de données TRANSFAC fournit différentes matrices poids-position pour chaque facteur provenant d'expériences et analyses différentes. Quatre séquences d'intérêt ont été récupérées avec l'outil retrieve-ensembl-seq à partir du nom du gène et de l'organisme, en spécifiant d'éviter les séquences redondantes dues aux transcrits alternatifs et en précisant de récupérer uniquement le promoteur de la position -750 à la position +200 par rapport au TSS, de façon à couvrir une région de plus ou moins 500pb de part et d'autre des polymorphismes *TNF-244/TNF-238* d'intérêt. Une fois les séquences présentant les différentes combinaisons *TNF-244G/TNF-238G*, *TNF-244G/TNF-238A*, *TNF-244A/TNF-238G*, *TNF-244A/TNF-238A* récupérées, elles ont été balayées par les matrices de TRANSFAC à l'aide de l'outil matrix-scan-quick en spécifiant un modèle de fond de Markov d'ordre 2, estimé sur le génome d'*Homo sapiens*. Un seuil de p-valeur à 0,0001 a été fixé (on s'attend donc à un faux-positifs tous les 10kb). Pour chacune des séquences scannées, les facteurs de transcription ayant obtenus des p-valeurs significatives pour les sites présentant les deux polymorphismes ont été sélectionnés. Un dernier filtre permettant de sélectionner les facteurs de transcription présentant des p-valeur correspondant au profil des protéines nucléaire retardées sur le gel retard a été appliqué, ces facteurs constituant donc les meilleurs candidats.

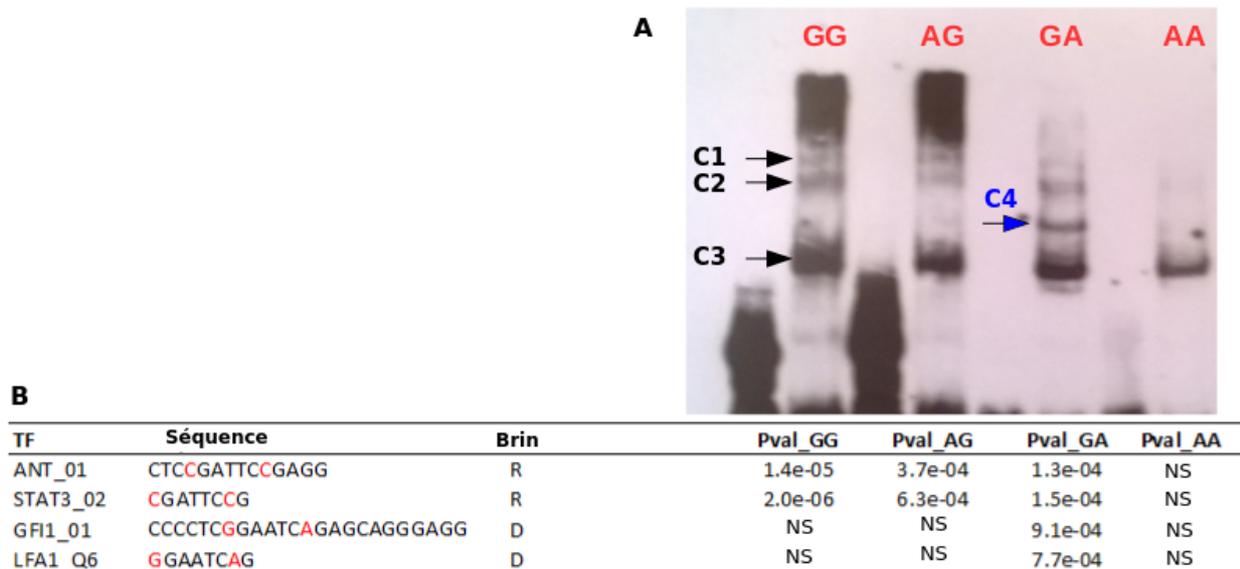


Fig. 25. Fixation de protéines nucléaires à la séquence présentant les variants *TNF-244/TNF-238* et prédiction in silico de facteurs de la transcription candidats correspondants aux profils du gel retard. A. Résultats d'expérience de gel retard en présence de sondes biotinylées présentant les différentes combinaison *TNF-244/TNF-238* (indiquées en rouges). Les 3 bandes retardées au niveau du puits 2 correspondent à 3 complexes ADN-protéines indiquant que 3 complexes protéiques C1, C2 et C3 lient la sonde *TNF-244G/TNF-238G* biotinylée (flèches noires). Une diminution de l'intensité de ses bandes dans les puits 3 (*TNF-244A/TNF-238G*), 4 (*TNF-244G/TNF-238A*) et 5 (*TNF-244A/TNF-238A*) suggère une fixation préférentielle pour la combinaison *TNF-244G/TNF-238G*. A noter la flèche bleu au niveau du puits 4, montre l'apparition d'un nouveau complexe ADN-protéine C4, indiquant la fixation exclusive d'un complexe protéique à la sonde présentant la combinaison (*TNF-244G/TNF-238A*). La présence de cette bande retardée uniquement en présence de la combinaison *TNF-244G/TNF-238A* suggère que cette combinaison crée un site de fixation pour ce complexe protéique. **B.** Prédiction bioinformatique de facteurs de la transcription candidats. Les différentes colonne indiquent successivement l'identité du facteur (plus précisément l'identité de la matrice poids-position utilisée pour scanner la séquence), la séquence reconnue par ce facteur (en rouge sont indiqués les variants *TNF-244/TNF-238*), le brin fixé et les p-valeurs obtenues pour chacune des combinaison. ANT et STAT présentent les plus petites p-valeurs avec la combinaison *TNF-224G/TNF-238G*, ce qui correspond au profil des bandes retardée sur le gel. GFI1 et LFA1 ne présentent de p-valeur significative qu'avec la combinaison *TNF-244G/TNF-238A*, ce qui correspond là encore au profil de la bande retardée sur le gel uniquement pour cette combinaison. TF : facteur de transcription, NS : non significatif.

ORIGINAL ARTICLE

Association of a functional TNF variant with *Plasmodium falciparum* parasitaemia in a congolese population

TN Nguyen^{1,2,3}, S Baaklini^{1,2}, F Koukouikila-Koussounda^{4,5}, M Ndounga⁶, M Torres^{1,2}, L Pradel^{1,2}, F Ntoumi^{4,5,7} and P Rihet^{1,2}

Several studies have provided evidence of both helpful and harmful effects of *TNF* on the outcome of *Plasmodium falciparum* malaria infection. Several *TNF* polymorphisms that are located within non-coding regions have been associated with parasitaemia, mild malaria or severe malaria. We investigated the association of *TNF1304* (rs3093664), *TNF-308* (rs1800629), *TNF-238* (rs361525) and *TNF-244* (rs673) with mild malaria and symptomatic maximum parasitaemia in a population-based design ($n = 310$). We obtained nominal evidence for an association between symptomatic maximum parasitaemia and *TNF-308*, *TNF-238*, and *TNF-244* on the one hand, and between the number of mild malaria attacks and *TNF-244* on the other hand. After accounting for multiple tests, we confirmed the association of symptomatic maximum parasitaemia with *TNF-244*. We further provide bioinformatics and experimental evidence that *TNF-244* has a cis-regulatory effect. This is the first report that emphasizes the potential role of *TNF-244* in malaria.

Genes and Immunity advance online publication, 13 July 2017; doi:10.1038/gene.2017.13

INTRODUCTION

Tumor necrosis factor (TNF) α is a cytokine, which has a prominent role in inflammation, immune responses and apoptosis. Its involvement in infectious diseases such as tuberculosis,^{1,2} leishmaniasis^{3,4} or toxoplasmosis^{5,6} has made it an interesting candidate gene for genetic association studies.

With regard to malaria, several studies have provided evidences of either helpful or harmful effects of TNF α on disease severity and outcome. It has been shown to participate in the elimination of the parasite, and therefore in the control of parasitaemia.⁷ In humans, TNF acts as a pyrogenic and proinflammatory molecule and is involved in the killing of *Plasmodium falciparum* mediated by effector cells in the presence of antibodies,^{8,9} whereas *Tnf*-deficient mice have higher parasitaemia than the corresponding wild-type mice.¹⁰ However, high levels of TNF have been associated with severe malaria,^{11,12} whereas TNF and lymphotoxin and their receptors have been shown to be involved in mouse cerebral malaria.¹³

Several genetic studies have evidenced the association between polymorphisms within *TNF* promoter and parasitaemia, mild malaria and severe malaria.^{14–16} In addition, linkage studies have revealed a linkage of a region containing *TNF* to parasitaemia and mild malaria in a population from Burkina Faso, suggesting an important effect of the genetic variation on the malaria phenotypes.^{14,17,18} In particular, we reported in the same population a genome-wide significant linkage and an association of *TNF* polymorphisms with parasitaemia or mild malaria,^{14,18,19} including *TNF1304*, *TNF-308* and *TNF-238*. Limited human genetic data in relation with infectious diseases are available from the Republic of Congo,²⁰ which is mainly composed of bantu people. Therefore, it appears interesting in the present study to screen for the presence of *TNF1304*, *TNF-308*, *TNF-238* and *TNF-244*, which is

close to *TNF-238*, in a Congolese population. Also, we assessed their association with mild malaria and parasitaemia, and investigated their potential cis-regulatory effect.

RESULTS

Phenotype and genotype results

A malaria attack can be defined as a fever episode with positive parasitaemia. As fever may be due to other pathogens, it has been suggested to apply a parasitaemia threshold; this increases the probability that fever is caused by *P. falciparum*.²¹ Thus, we used both phenotypes to characterize malaria attacks. As shown in Table 1, 142 individuals did not suffer with fever, and were considered asymptomatic, whereas 168 individuals had fever and parasitaemia. Among the 168 individuals with symptomatic parasitaemia, 101, 36, 16, 13 and 2 individuals had 1, 2, 3, 4 and 5 fever episodes, respectively. As shown in Table 1, 29 individuals had parasitaemia lower than 5000 infected red blood cells per μ l, whereas 139 had parasitaemia higher than 5000. Among the 139 individuals, 72, 36, 16, 13 and 2 individuals had 1, 2, 3, 4 and 5 fever episodes, respectively. The median of maximum parasitaemia was 21 082, whereas the first and third quartiles were 8650 and 51 190, respectively (Table 1).

All the 310 individuals were successfully genotyped for rs1800629 (*TNF-308*), rs673 (*TNF-244*) and rs361525 (*TNF-238*). For rs3093664, 309 individuals were successfully genotyped. GG and GA genotypes were identified for rs673 and rs361525, whereas GG, GA, and AA genotypes were identified for rs1800629 and rs3093664. We checked the Hardy–Weinberg equilibrium for the SNPs ($P > 0.21$), and further calculated the allelic frequencies for rs1800629 (p(G)=0.90 and p(A)=0.10), rs673 (p(G)=0.98 and p(A)=0.02), rs361525 (p(G)=0.93 and p(A)=0.07) and rs3093664

¹INSERM, UMR1090 TAGC, Marseille, France; ²Aix-Marseille Université, Marseille, France; ³University of Science and Technology of Hanoi (USTH), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), Hanoi, Vietnam; ⁴Fondation Congolaise pour la Recherche Médicale (FCRM), Villa D6, Cité OMS AFRO, Brazzaville, République du Congo; ⁵Faculté des Sciences et Techniques, Université Marien Ngouabi, Brazzaville, République du Congo; ⁶Unité de Recherche sur le Paludisme, Centre d'Etudes sur les Ressources Végétales (CERVE), Brazzaville BP, République du Congo and ⁷Institute for Tropical Medicine, University of Tübingen, Tübingen, Germany. Correspondence: Professor P Rihet, Aix-Marseille université, INSERM U1090-TAGC, 163 Av de Luminy, Marseille Cedex 9, 13288 France. E-mail: pascal.rihet@univ-amu.fr

Received 16 March 2017; revised 8 May 2017; accepted 10 May 2017

Malaria attack	Number of individuals (%)	Maximum parasitemia during fever episodes
No fever	142 (45.8%)	–
Fever with parasitaemia	168 (54.2%)	21 802 ^a (8650–51 190) ^b
Fever with parasitaemia < 5000	29 (9.4%)	1655 (1023–3062)
Fever with parasitaemia > 5000	139 (44.8%)	29 263 (14 628–54 157)

^aMedian. ^bFirst and third quartiles.

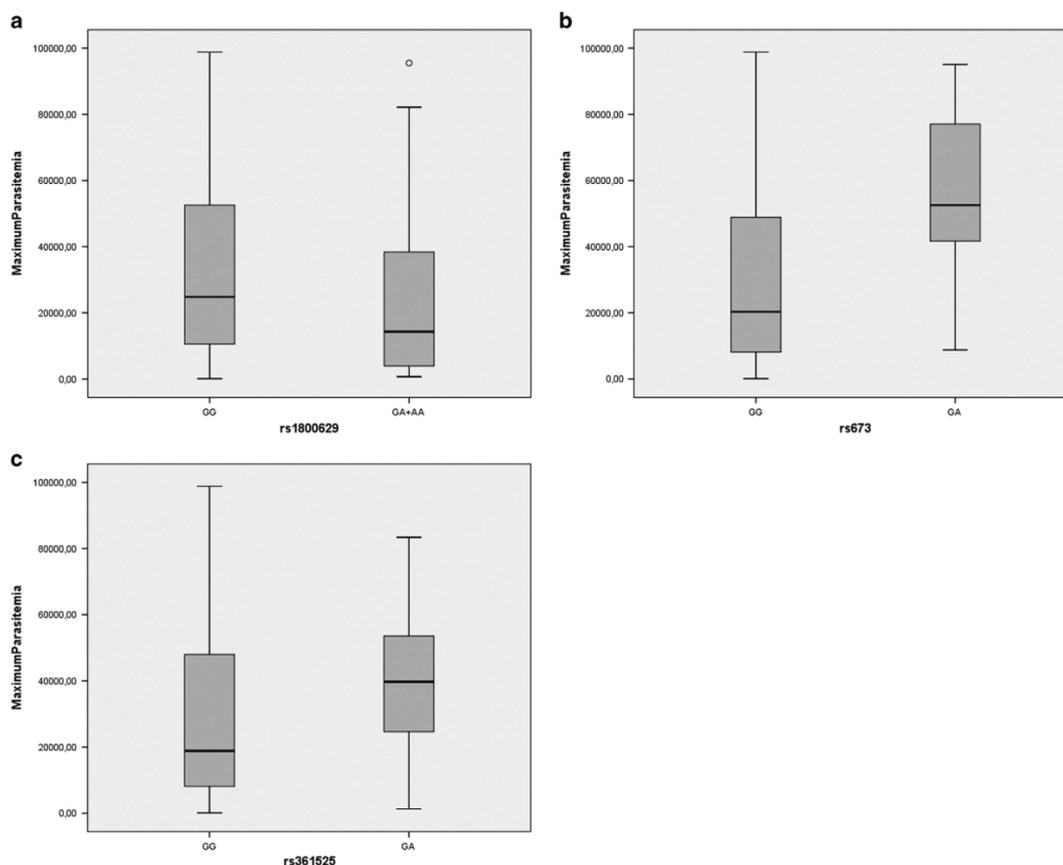


Figure 1. Box plot showing *Plasmodium falciparum* maximum parasitaemia in individuals with different genotypes for (a) rs1800629 (*TNF-308*), (b) rs673 (*TNF-244*) and (c) rs361525 (*TNF-238*). The median value, and the 25th to 75th percentile are shown. We grouped GA and AA individuals for rs1800629 because there were only four AA individuals.

($p(A)=0.87$ and $p(G)=0.13$). As only four AA individuals were recorded for rs1800629, and only four GG individuals were recorded for rs3093664, we grouped GA and AA individuals for rs1800629 and GG and GA individuals for rs3093664 in further association analyses.

Association of SNPs with mild malaria and maximum parasitaemia
 As there was no association of age with maximum parasitaemia in the study population (data not shown), we did not take into account age to assess the effect of SNPs. Mann–Whitney test was used because the distribution of maximum parasitaemia was not

normal, on the basis of the Shapiro–Wilk test. We detected an association at the 0.05 level for rs1800629 (A allele being negatively associated, $P=0.045$), rs673 (A allele being positively associated, $P=0.007$) and rs361525 (A allele being positively associated, $P=0.045$), as shown in Figure 1. There was no effect of rs3093664 ($P>0.05$).

As age influenced both fever phenotype with positive parasitaemia and fever phenotype with parasitaemia higher than 5000, we used the logistic and poisson regression methods to assess the association between the genotypes and the phenotypes. First, we assessed the association of SNPs with the binary phenotypes by using the logistic regression method; the SNPs

Table 2. Transcription factors binding the sequences containing rs1800629, rs673 and rs361525

rs1800629	rs673	rs361525
IKZF1	FOXO1	FOXO1
NFKB1	IKZF1	IKZF1
NFYB	MAX	MAX
RUNX1	MAZ	MAZ
SPI1	MXI1	MXI1
TCF12	NF1C	NF1C
VDR	NFKB1	NFKB1
	NFYB	NFYB
	RELA	RELA
	RUNX1	RUNX1
	SPI1	SPI1
	STAT3	STAT3
	TAL1	TAL1
	TCF12	TCF12
	VDR	VDR

were associated with neither fever phenotype with positive parasitaemia nor fever with parasitaemia higher than 5000. Furthermore, we assessed the association of SNPs with the number of febrile episodes with and without parasitaemia threshold by using poisson regression method. There was no association for rs1800629, rs361525 and rs3093664. In contrast, we detected an association of rs673 with the number of fever episodes with positive parasitaemia ($P=0.033$, A allele positively associated with fever) and the number of fever episodes with parasitaemia higher than 5000 ($P=0.050$, A allele positively associated with fever).

We further applied a correction for multiple genetic association tests, which makes use of correlation information. On this basis, only the association of rs673 with parasitaemia remained significant at the adjusted level $\alpha_k=0.05$ ($P_c=0.032$).

Functional analyses of SNPs

We investigated the potential functional effect of the SNPs associated with malaria phenotypes by using the bioinformatics GWAVA (genome-wide annotation of variants) tool and the ReMap catalogue to look for co-localisation of SNPs and transcription factor binding sites. Also, we mapped the peak of ChIP-seq experiments covering a total of 237 transcription factors by using the ReMap tool. We found 7, 15 and 15 transcription factors, which bind sequences containing rs1800629, rs673 and rs361525, respectively (Table 2). Furthermore, we found that rs1800629, rs673 and rs361525 had a score of 0.99, 0.99 and 0.94, respectively, indicating a regulatory effect of those SNPs. Interestingly, rs3093664 that was not associated with malaria phenotypes had a score of 0.72. We further checked for the score of 245 non-coding SNPs located within 5'UTR, 3'UTR, downstream, upstream or intron regions of the *TNF* gene. rs1800629, rs673 and rs361525 belonged to the 15% of SNPs having the highest scores (Supplementary Table 1).

Thus, we performed a gene reporter assay to assess the effect of rs673 (*TNF-244*) and rs361525 (*TNF-238*) on the promoter activity. Figure 2 shows the results for six experiments performed in the THP1 cell line. Paired *t*-tests allowed us to show a significant effect of both rs361525 and rs673 on the promoter activity by comparing the promoter activity of the wild-type sequence to the one of the mutated sequence at either rs361525 or rs673. The mutated *TNF* promoter containing *TNF-238A* and the one containing *TNF-244A* showed a significant decrease in activity compared with the wild-type *TNF* promoter containing the *TNF-238G* ($P=0.047$) and *TNF-244G* alleles ($P=0.018$), respectively.

Moreover, we performed an EMSA (electrophoretic mobility shift assay) to investigate the binding of nuclear proteins to the sequence containing rs673 and rs361525. As shown in Figure 3,

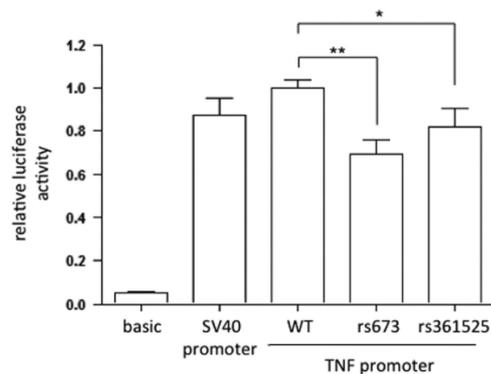
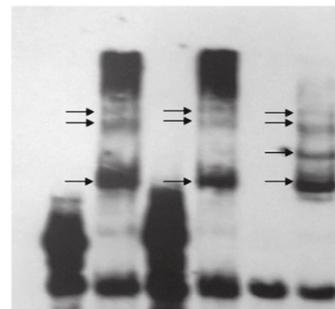


Figure 2. Results of a gene reporter assay comparing the different promoter variants. The pGL3-basic Vector and the pGL3-SV40 promoter were the negative and the positive controls, respectively. The wild-type *TNF* promoter in the pGL3-basic Vector contained *TNF-244G* and *TNF-238G* alleles; its activity was set at 1. The promoters mutated either at the rs673 (*TNF-244*) site or at the rs361525 (*TNF-238*) site contained *TNF-244A* and *TNF-238A* alleles, respectively. The mean and the s.e.m. of six experiments are shown for each promoter. *T*-test was used to assess the difference between the wild-type promoter and the mutated promoter because the distribution of the promoter activity was normal, on the basis of the Shapiro–Wilk test. The significance is shown (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.02$).



Lane		1	2	3	4	5	6
Probe	rs361525	G	G	G	G	A	A
	rs673	G	G	A	A	G	G
Nuclear extracts		-	+	-	+	-	+

Figure 3. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) results for rs673 (*TNF-244*) and rs361525 (*TNF-238*). Delayed bands that correspond to probe-nuclear protein complexes are shown by arrows. EMSA patterns are shown for the sequence containing the wild-type alleles *TNF-238G* and *TNF-244G* (track 2), the one containing the mutant *TNF-244A* allele (track 4), and the one containing the mutant *TNF-238A* allele (track 6).

the sequence carrying the mutant allele showed differential patterns compared with the sequence carrying the wild-type allele in EMSA for both rs673 and rs361525. Also, the wild-type sequence containing *TNF-244G* and *TNF-238G* alleles showed three delayed bands that were more prominent compared with

either the sequence containing *TNF-244A* allele or the one containing *TNF-238A*, respectively. In addition, the sequence containing *TNF-238A* allele showed an additional delayed band compared with the sequences containing *TNF-238G*.

DISCUSSION

In the present study, we have examined the association of *TNF1304* (rs3093664), *TNF-308* (rs1800629), *TNF-238* (rs361525) and *TNF-244* (rs673) SNPs within the *TNF* gene with mild malaria and maximum symptomatic parasitaemia in a population living in the Republic of Congo. We further investigated their potential cis-regulatory effect. Among the 4 polymorphisms analysed, we found a nominal association between three of them (*TNF-238*, *TNF-244*, *TNF-308*) and mild malaria attack or maximum parasitaemia, whereas there was no association between *TNF1304* and those phenotypes. *TNF-244* remained associated with parasitaemia after correcting for multiple tests.

Also, we report a significant association between *TNF-244A* and parasitaemia, and a trend in favour of association between *TNF-244A* and the number of mild malaria attacks. To our knowledge, this is the first report on the effect of this polymorphism on malaria phenotypes. Furthermore, the ReMap tool led to identify several transcription factors that bind DNA sequence containing *TNF-244*, whereas the bioinformatic analysis based on the GWAVA tool yielded a high score. This suggests that the SNP is located within a regulatory region. Moreover, our experimental analyses provide evidence of a cis-regulatory effect of *TNF-244*. Indeed, *TNF-244A* decreased TNF promoter activity based on a gene reporter assay, whereas *TNF-244A* diminished the binding of nuclear proteins by using an EMSA. Further studies will be, nevertheless, helpful to test whether *244A* carriers with malaria infection show a decreased production of TNF in relevant cells, such as monocytes, and thus to relate the promoter activity to malaria infection.

We have also detected a trend in favour of the association of *TNF-308* and *TNF-238* and with maximum parasitaemia. Although the association was no more statistically significant after correcting for multiple tests, these results are in line with association results obtained in other countries on the one hand, and with functional studies on the other hand. Also, *TNF-308* has been associated with mild malaria in Burkina Faso,¹⁴ parasitaemia in Burkina Faso and Kenya^{14,15} and severe malaria in Gambia, Kenya and Sri Lanka.^{15,16,22} These results suggest that *TNF-308* influences several malaria phenotypes. In this way, the bioinformatics analyses yielded strong evidence of a regulatory effect of *TNF-308A*, and are consistent with the experimental results reported by several authors showing that *TNF-308A* increased TNF production.^{23–25}

Similarly, *TNF-238* has been associated with parasitaemia in Burkina Faso, with severe anaemia in Gambia,²⁶ and cerebral malaria in Kenya.²⁷ However, it was associated with neither severe anaemia in Kenya and Malawi²⁸ nor cerebral malaria in Gambia.^{26,27} Such contradictory results may be explained by the effect of other SNPs on malaria phenotypes or the TNF production.²⁸ Alternatively, *TNF-238* may not have a molecular effect and may be in linkage disequilibrium with a causal SNP. Nevertheless, our bioinformatic and experimental analyses support the hypothesis that *TNF-238* has a regulatory effect with *TNF-238A* decreasing the promoter activity in the THP1 cell line. In the same way, *TNF-238A* was shown to decrease the promoter activity in Jurkat and Raji cell lines.²⁹

In conclusion, we found a significant association between symptomatic parasitaemia and *TNF-244* (rs673) and we provide evidence that *TNF-244* alters both the binding of nuclear proteins and the promoter activity. In addition, we observed a trend of the association between *TNF-244* and the number of malaria attacks, on the one hand, and between *TNF-308* (rs1800629) and *TNF-238*

(rs361525) and symptomatic parasitaemia, on the other hand. Also, our results further support that *TNF-308* (rs1800629) and *TNF-238* (rs361525) influence malaria phenotypes, and provide evidence of a role for *TNF-244* (rs673), which is close to *TNF-238* (rs361525). Interestingly, both SNPs are located within a sequence binding the same transcription factors, and may have a synergistic effect. Further studies are, nevertheless, required to confirm the role of *TNF-244* in human malaria, and to investigate the putative synergistic effect of *TNF-244* and *TNF-238* on gene expression in cells that are relevant for clinical malaria.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study population has been described elsewhere.³⁰ The population lived in Brazzaville, the capital city of Congo, which is located along the Congo river. Samples were collected at Makélékélé health division from 317 individuals living in three districts: Kinsana, Mbouono and Ngoko in the south area of Brazzaville. Malaria is transmitted throughout the year with *P. falciparum* being the predominant species and *Anopheles gambiae* is the main mosquito vector. We considered that all children were similarly exposed to malaria because they were living in similar conditions in the same semi urban area along the Congo river. All 317 individuals were children aged from 1 to 9 years, belonging to the Bantu population. Blood samples were collected at enrolment from April to June 2010 and at every malaria episode during 1 year followed up. During 1 year of the program, if an individual had any symptoms related to clinical malaria such as fever, muscular pain, headache, dry cough, the child was invited at the health centre for clinical examination. In case of positive thick and thin blood smears and axillary temperature ≥ 37.5 °C, children were treated with artesunate-amodiaquine or artemether-lumefantrine. The ethical approval was given by the Institutional Ethics Committee for Research on Health Sciences of the Republic of Congo.

Phenotypes

In case of fever (axillary temperature ≥ 37.5 °C), blood sample was collected, and parasitaemia was measured as previously described.³⁰ In brief, thick and thin blood films were stained with 10% Giemsa solution for 15 min. Parasite determination and measurement were established by two independent readings. The parasitaemia was defined as the number of parasitized erythrocytes observed per μ l of blood. *P. falciparum* was the only *Plasmodium* species detected. Maximum parasitaemia was the highest symptomatic parasitaemia that was measured in each individual during the study time. In all, 173 individuals had at least one fever episode during the time study. Among 173 individuals with fever, no parasite was detected for five individuals, resulting in 168 individuals with positive parasitaemia. A malaria fever episode was defined on the basis of the presence of both fever and blood parasites; also, individuals without fever episode were considered asymptomatic, whereas those with fever and negative parasitaemia were registered with an unknown phenotype. Alternatively, a malaria fever episode was defined on the basis of the presence of both fever and parasitaemia higher than 5000 parasitized erythrocytes per μ l of blood; in this case, individuals without fever were considered asymptomatic, whereas those with fever and parasitaemia lower than 5000 parasitized erythrocytes per μ l of blood were registered with an unknown phenotype. The number of fever episodes with positive parasitaemia, on the one hand, and the number of fever episodes with parasitaemia higher than 5000, on the other hand, were evaluated for each individual.

DNA extraction and amplification

Genomic DNA was extracted from 200 μ l of peripheral whole blood samples obtained from patients and asymptomatic children ($n=310$) using the commercially available QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.³⁰ The total DNA samples were then amplified by IllustraGenomiPhi V2 DNA Amplification kit (GE Healthcare Life Sciences, France, Europe) using the following protocol: 1 μ l contains ~ 10 ng of genomic DNA was mixed with 9 μ l of Sample Buffer. The mixture was heated to 95 °C for 3 min to denature genomic DNA and then cooled down to 4 °C or incubated on ice. For DNA amplification, a master mix solution includes 9 μ l of Reaction Buffer and 1 μ l of Phi29 DNA polymerase enzyme mix was added directly in the

sample. Samples were then incubated at 30 °C for 1.5 h and heated to 65 °C for 10 min to inactivate the enzyme. The amplification product was diluted up to 1 ml in total volume by pure water to reach DNA concentration of about 4–7 ng μl^{-1} and was stored at –20 °C until use.

Genotyping

The primer pair to amplify DNA fragments containing *TNF1304* (rs3093664), *TNF-308* (rs1800629), *TNF-238* (rs361525) and *TNF-244* (rs673) was designed with the PRIMER program as described by Flori *et al.*¹⁴ Polymerase chain reaction (PCR) amplification was carried out in 50 μl reaction volumes with 20 ng of genomic DNA, 1 \times PCR buffer (20 mM of Tris-HCl pH 8.4, 50 mM of KCl, 1.5 mM of MgCl₂), 1 mM of dNTPs, 0.5 mM of each primer and 1 U of Taq DNA polymerase (Qiagen). Thermocycling started with a single denaturation step for 5 min at 95 °C, following 40 cycles of denaturation for 40 s at 95 °C, annealing for 30 s at 59 °C and extension at 72 °C for 40 s. One final extension step was added for 10 min at 72 °C. The PCR products were checked by 1.5% agarose gel electrophoresis to verify the product size and purified with the PCR DNA Purification Kit (Qiagen). A total of 35 fmol of the purified PCR product was used as template for sequencing using the Dye Terminator Cycle Sequencing Quick Start Kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) on a Beckman Coulter CEQ 8800 sequencer followed manufacturer's protocol.

Statistical analyses

Hardy–Weinberg equilibrium was tested and allelic frequencies were calculated, as described.³¹ Linkage disequilibrium was assessed between pairs of SNPs by using the r^2 statistics implemented in the program HAPLOVIEW.³² Mann–Whitney test was used to assess the association between parasitaemia and genotypes. Logistic and poisson regressions were used to evaluate the association of the genotype with mild malaria as a binary trait and the number of malaria attacks, respectively; the logistic and poisson regression methods allowed us to include age as a covariate. Student's *t*-test was used after checking data distribution with Shapiro–Wilk method; paired *t*-test was used when the data could be paired. Mann–Whitney, *t*-test, and multivariate regressions were performed by using the SPSS software. All the tests were two-sided. G*Power software was used to compute statistical power for *t*-tests and Mann–Whitney tests. A modified Sidak correction method that makes use of the correlation information was used to correct for multiple tests.³³ In brief, the adjusted significance level and the observed corrected *P* value are $\alpha_k = 1 - (1 - \alpha)^{m_k}$ and $P_{ck} = 1 - (1 - P_k)^{m_k}$ respectively, where $m_k = K^{1-r_k}$ and $r_k = (\sum_{j \neq k} r_{jk}) / (K - 1)$, K is the number of comparisons, and r_{jk} is the correlation between the *j*th and the *k*th parameter. When the average correction coefficient was zero, the adjustment was done according to the Bonferroni method, and when it was one, the unadjusted and the adjusted *P*-values were the same. The *r*-value was used to account for allelic association.

Bioinformatic search for regulatory SNPs

The potential regulatory effect of SNPs was scored by using the GWA tool.³⁴ It integrates genomic and epigenomic data to prioritize non-coding variants likely altering the expression of the gene, and it calculates three scores ranging from 0 to 1; the highest scores indicate a likely regulatory effect of the SNP. The so-called unmatched score that led to the best discrimination of regulatory variants³⁴ was used in the present study.

Moreover, we explored ChIP-seq results by using the ReMap catalogue containing 395 data sets covering 237 transcription factors to identify transcription factors that bind DNA sequence containing the studied SNPs.³⁵ To this aim, the intersectbed tool implemented in the ReMap catalogue was used to intersect the genomic coordinates of SNPs and those of the ChIP-seq peaks.

Electrophoretic mobility shift assay

Nuclear proteins were extracted from 1×10^6 NK92 cells using the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (ThermoScientific). Complementary single-stranded with biotin-3'-end-labeled oligonucleotides were purchased from Eurofins (Eurofins SARL, Strasbourg, France) for wild-type alleles (Biotin-5'-gacccccctcgaatcgagcaggag-3' and Biotin-5'-ctcttcgctcgattccgaggggggtc-3') for wild-type and mutant allele at *TNF-238* (rs361525) (Biotin-5'-gacccccctcgaatcgagcaggag-3' and Biotin-5'-ctcttcgcttcgattccgaggggggtc-3') or *TNF-244*(rs673) (Biotin-5'-gacccccctcagaa tcggagcaggag-3' and Biotin-5'-Ctcttcgctcgcgattctgaggggggtc-3'). Double-stranded oligonucleotides were prepared by melting at 95 °C for 10 min in

STE buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), followed by an annealing phase by gradually reduce the heat until room temperature. A total of 10 μg of nuclear proteins were incubated with the double-stranded oligonucleotides for 30 mins on ice in binding buffer (Binding Buffer 1 \times , 2.5% glycerol, 5 mM MgCl₂, Poly (dI.dC) 100 ng μl^{-1} and 0.05% NP-40). After 30 min incubation with the biotinylated probes at room temperature, the samples were migrated on a 6% polyacrylamide gel in 0.5 \times Tris-Glycine buffer for 1 h at 100 V at 4 °C. Then they were transferred onto a nylon membrane in a 0.5 \times TBE buffer for 1 h at 100V at 4 °C. After being fixed on the membrane by ultraviolet, samples were revealed by autoradiography with streptavidin coupled to peroxidase in the presence of luminol (substrate).

Gene reporter assay

A 513pb DNA fragment upstream of the TNF α translation start site (hg38position: chr6:31575286–31575798) was amplified from ADNG of THP1 (ATCC TIB-202) monocyte cell line by PCR using Hercules II Fusion enzyme (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; cat# 600679) and the forward primer (CAGTCAGTGGCCAGAGAAGAC) and the reverse primer (ACGTCCCGGATCATGCTTTC). For cloning TNF promoter 513pb DNA fragment, we used the 'Sticky end PCR Cloning' method.³⁶ Two PCR were performed on this fragment: PCR1 with the forward primer (CGCGTC AGTCAGTGGCCAGAGA) and the reverse primer (GACGCTCCGGATCATGCTT), and PCR2 with the forward primer (TCAGTCAGTGGCCAGAGAAGAC) and the reverse primer (TCGAGACGTCCCGGATCATGC). The PCR products from PCR1 and PCR2 were mixed and hybridized together to create a 513pb DNA fragment with *Xho*I and *Mlu*I sticky end. This fragment was cloned into the *Mlu*I-*Xho*I sites of pGL3-basic Vector (Promega cat# E1751, Madison, WI), which contained the firefly luciferase coding sequence. To perform on the wild-type *TNF* promoter single mutations on the two interested SNP positions (rs673 or *TNF-244*; rs361525 or *TNF-238*), the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA; cat#E0554S) was used according to substitutions instructions. Therefore, *TNF-244G* and *TNF-238G* alleles were replaced with *TNF-244A* and *TNF-238A* alleles, respectively. Two new plasmids were constructed: the first one contained *TNF-244A* allele, whereas the second one contained *TNF-238A* allele.

THP1 (ATCC TIB-202) monocyte cells were grown in Gibco RPMI 1640 medium (ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA; cat#11875-101) supplemented with 10% fetal bovine serum. Transfection was performed with Neon Transfection System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following constructor instructions. For each out of the six tests performed, 10⁶ cells were co-transfected with 1 μg of control vector (pGL3-basic vector for negative control, pGL3-SV40 promoter for a positive control) or with 1 μg of tested construction (the wild-type *TNF* promoter, the mutated *TNF* promoter carrying *TNF-244A* or the mutated *TNF* promoter carrying *TNF-238A*) and 200 ng of pRL-SV40 (a plasmid encoding *Renilla* luciferase from Promega) used as transfection efficiency control. Transfected cells were maintained at 37 °C in 5% CO₂ during 24 h. Firefly and *Renilla* luciferase values were obtained by analyzing 20 μl of cell lysate according to standard instructions provided in the Dual Luciferase Kit (Promega, Madison, WI, USA; cat# E1910) in a TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader (Berthold technologies ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the individuals for participating in the study. We thank Laurence Borge for assistance and the use of the cell culture platform facility (CRCM U1068, Marseille). This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and Aix-Marseille University. TNN and SB were supported by a PhD fellowship from the Vietnamese government and the French ministry, respectively. FKK and FN are members of the Central African Network on Tuberculosis, HIV/AIDS and Malaria, CANTAM) supported by EDCTP.

REFERENCES

- Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguat PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989; **56**: 731–740.

- 2 Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ *et al*. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995; **2**: 561–572.
- 3 Titus RG, Sherry B, Cerami A. Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1989; **170**: 2097–2104.
- 4 Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M. Tumour necrosis factor (TNF α) in leishmaniasis. I. TNF α mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology* 1990; **69**: 570–573.
- 5 Sibley LD, Adams LB, Fukutomi Y, Krahenbuhl JL. Tumor necrosis factor- α triggers antitoxoplasmal activity of IFN- γ primed macrophages. *J Immunol* 1991; **147**: 2340–2345.
- 6 Johnson LL. A protective role for endogenous tumor necrosis factor in *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun* 1992; **60**: 1979–1983.
- 7 Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med* 1990; **172**: 1633–1641.
- 8 Krensner PG, Winkler S, Brandts C, Wildling E, Jenne L, Graninger W *et al*. Prediction of accelerated cure in *Plasmodium falciparum* malaria by the elevated capacity of tumor necrosis factor production. *Am J Trop Med Hyg* 1995; **53**: 532–538.
- 9 Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med* 1995; **182**: 409–418.
- 10 Hernandez-Valladares M, Naessens J, Musoke AJ, Sekikawa K, Rihet P, Ole-Moiyoi OK *et al*. Pathology of Tnf-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi* adami 408XZ. *Exp Parasitol* 2006; **114**: 271–278.
- 11 Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M *et al*. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* 1989; **320**: 1586–1591.
- 12 Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR *et al*. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 1990; **336**: 1201–1204.
- 13 Engwerda C, Belnoue E, Gruner AC, Renia L. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005; **297**: 103–143.
- 14 Flori L, Delahaye NF, Iraqi FA, Hernandez-Valladares M, Fumoux F, Rihet P. TNF as a malaria candidate gene: polymorphism-screening and family-based association analysis of mild malaria attack and parasitemia in Burkina Faso. *Genes Immun* 2005; **6**: 472–480.
- 15 Aidoo M, McElroy PD, Kolczak MS, Terlouw DJ, ter Kuile FO, Nahlen B *et al*. Tumor necrosis factor- α promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX. *Genet Epidemiol* 2001; **21**: 201–211.
- 16 McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF- α promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; **371**: 508–510.
- 17 Jepson A, Sisay-Joof F, Banya W, Hassan-King M, Frodsham A, Bennett S *et al*. Genetic linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in Gambian children: study of affected sibling pairs. *BMJ* 1997; **315**: 96–97.
- 18 Brisebarre A, Kumulungui B, Sawadogo S, Atkinson A, Garnier S, Fumoux F *et al*. A genome scan for *Plasmodium falciparum* malaria identifies quantitative trait loci on chromosomes 5q31, 6p21.3, 17p12, and 19p13. *Malaria J* 2014; **13**: 198.
- 19 Flori L, Sawadogo S, Esnault C, Delahaye NF, Fumoux F, Rihet P. Linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in families living in Burkina Faso. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 375–378.
- 20 Koukouikila-Koussounda F, Ntoumi F. Malaria epidemiological research in the Republic of Congo. *Malaria J* 2016; **15**: 598.
- 21 Rogier C, Commenges D, Trape JF. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitemia in highly endemic populations. *Am J Trop Med Hygiene* 1996; **54**: 613–619.
- 22 Wattavidanage J, Carter R, Perera KL, Munasingha A, Bandara S, McGuinness D *et al*. TNF α *2 marks high risk of severe disease during *Plasmodium falciparum* malaria and other infections in Sri Lankans. *Clin Exp Immunol* 1999; **115**: 350–355.
- 23 Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol* 1997; **34**: 391–399.
- 24 Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 3195–3199.
- 25 Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a re-assessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 1454–1462.
- 26 McGuire W, Knight JC, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *J Infect Dis* 1999; **179**: 287–290.
- 27 Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K *et al*. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 1999; **22**: 145–150.
- 28 Clark TG, Diakite M, Auburn S, Campino S, Fry AE, Green A *et al*. Tumor necrosis factor and lymphotoxin- α polymorphisms and severe malaria in African populations. *J Infect Dis* 2009; **199**: 569–575.
- 29 Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR *et al*. Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol* 2000; **114**: 1180–1183.
- 30 Koukouikila-Koussounda F, Ntoumi F, Ndounga M, Tong HV, Abena AA, Velavan TP. Genetic evidence of regulatory gene variants of the STAT6, IL10R and FOXP3 locus as a susceptibility factor in uncomplicated malaria and parasitaemia in Congolese children. *Malaria J* 2013; **12**: 9.
- 31 Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol* 2009; **169**: 505–514.
- 32 Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; **21**: 263–265.
- 33 Sankoh AJ, Huque MF, Dubey SD. Some comments on frequently used multiple endpoint adjustment methods in clinical trials. *Stat Med* 1997; **16**: 2529–2542.
- 34 Ritchie GR, Dunham I, Zeggini E, Flicek P. Functional annotation of noncoding sequence variants. *Nat Methods* 2014; **11**: 294–296.
- 35 Griffon A, Barbier Q, Dalino J, van Helden J, Spicuglia S, Ballester B. Integrative analysis of public ChIP-seq experiments reveals a complex multi-cell regulatory landscape. *Nucleic Acids Res* 2015; **43**: e27.
- 36 Zeng G. Sticky-end PCR. new method for subcloning. *BioTechniques* 1998; **25**: 206–208.

Supplementary Information accompanies this paper on Genes and Immunity website (<http://www.nature.com/gene>)

Résultat 2 : Analyse d'association et caractérisation fonctionnelle d'un variant du *NCR3* avec les accès palustres simples dans une population du Congo

Parmi les gènes situés sous le pic de liaison dans l'étude pangénomique conduite au Burkina Faso, on retrouve le gène *NCR3*, un gène codant pour un récepteur activateur des cellules NK : le récepteur NKp30. Une analyse d'association gène-candidat subséquente a révélé que le polymorphisme *NCR3-412* localisé dans le promoteur de ce gène est associé à la forme simple du paludisme.

Le récepteur de cytotoxicité naturelle NKp30 a été identifié par différentes études comme responsable de l'activation des cellules NK à l'origine de l'élimination de plusieurs cellules pathogéniques, telles que les cellules tumorales (Pende et al., 1999), les cellules infectées par les virus (Golden-Mason, Cox, Randall, Cheng, & Rosen, 2010), les cellules fongiques (S. S. Li et al., 2013) ou encore les cellules dendritiques immatures (Ferlazzo et al., 2002; Simhadri et al., 2008). Plusieurs études ont aussi démontré que les cellules NK interagissent directement avec des érythrocytes infectés par *Plasmodium* (Artavanis-Tsakonas et al., 2003; Baratin et al., 2007; Korbel et al., 2005). Cette interaction pourrait conduire à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et d'IFN- γ , à l'origine du contrôle de la parasitémie mais pourrait conduire aussi à une réponse cytotoxique déclenchée par la reconnaissance de ligands parasitaires exprimés à la surface des globules rouges infectés par les récepteurs des cellules NK, et plus précisément le récepteur NKp30 (Bouyou-Akotet et al., 2004; Qingfeng Chen et al., 2014; Hermsen et al., 2003; Mavoungou et al., 2007; Mavoungou, Luty, & Kremsner, 2003; Orago & Facer, 1991). Chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë, il a été démontré qu'une diminution de l'expression de NKp30 est corrélée à une diminution de la cytotoxicité des cellules NK (Costello et al., 2002).

Ainsi au vu de l'association du variant *NCR3-412* au Burkina Faso et du rôle biologique de la protéine NKp30, nous avons émis l'hypothèse qu'un polymorphisme qui altérerait l'expression de ce récepteur aurait un impact sur le risque de développer un accès palustre simple de part une modification de la réponse immunitaire des NK dirigée contre les érythrocytes infectés. Afin de

confirmer l'implication de ce polymorphisme et de caractériser plus précisément son effet cis-régulateur, nous avons en premier lieu entrepris une étude de répllication dans une population indépendante du Congo, puis nous avons exploré *in silico* et *in vitro* l'effet du polymorphisme sur la fixation de facteurs de transcription et l'expression du gène. Enfin, après avoir identifié *in silico* des facteurs de la transcription candidats, nous avons évalué *in vitro* l'effet du variant sur la fixation de ces facteurs validant de ce fait leur implication.

Ainsi, les résultats obtenus ont confirmé que sous l'hypothèse d'un modèle génétique dominant, en accord avec l'étude menée au Burkina Faso, il existe une association significative entre le polymorphisme et la survenue de la maladie ainsi qu'entre le polymorphisme et le nombre d'accès fébrile. Après avoir intégré dans l'analyse de régression multivariée les facteurs confondants connus pour avoir un effet sur le développement du paludisme simple, l'association du polymorphisme *NCR3-412* est toujours significativement associée.

L'âge semble néanmoins avoir un effet modulateur sur la susceptibilité de l'hôte au paludisme simple dans la population congolaise. En effet, après stratification de l'analyse en fonction de l'âge, les résultats montrent que le polymorphisme *NCR3-412* est associé au paludisme uniquement dans la sous-population d'individus âgés de plus de 4 ans. Ceci n'avait pas pu être montré dans l'étude Burkinabé car la population étudiée était plus âgée (seulement 13 % des individus étaient âgés de moins de 4 ans contre 53,7 % dans la population du Congo).

Des expériences de gène-rapporteur nous ont permis de confirmer l'effet cis-régulateur du polymorphisme, à savoir que la présence de *NCR3-412C* altère significativement l'expression du gène, avec une diminution de l'expression de 37 %. De plus les expériences de gel-retard ont montré que 2 complexes protéiques se fixent dans la région présentant le polymorphisme *NCR3-412* et que ces 2 complexes se fixent préférentiellement au variant G ; suggérant que ces complexes correspondent à des facteurs activateurs de la transcription.

Enfin, après avoir identifié *in silico* des facteurs de la transcription candidats, nous avons pu montrer par des expériences de pull-down/western blot que non seulement RUNX3 et STAT4 se fixe à la région présentant *NCR3-412*, mais aussi

que ces deux facteurs se fixent préférentiellement en présence du variant *NCR3-412G*.

Ainsi, nous avons pu proposer un modèle biologique selon lequel, la présence du variant *NCR3-412C* altère la fixation de RUNX3 et STAT4 au niveau du promoteur du gène *NCR3*, entraînant une sous-expression des récepteurs activateurs NKp30 à la surface des NK, une réponse immunitaire de ces cellules altérées et une sensibilité accrue aux accès simples. Au vu de la réplification de l'association du polymorphisme *NCR3-412* avec le paludisme simple dans une population indépendante et au vu des évidences d'un rôle, on peut suggérer que ce SNP est un variant causal et non en déséquilibre de liaison avec le variant causal (Fig. 26).

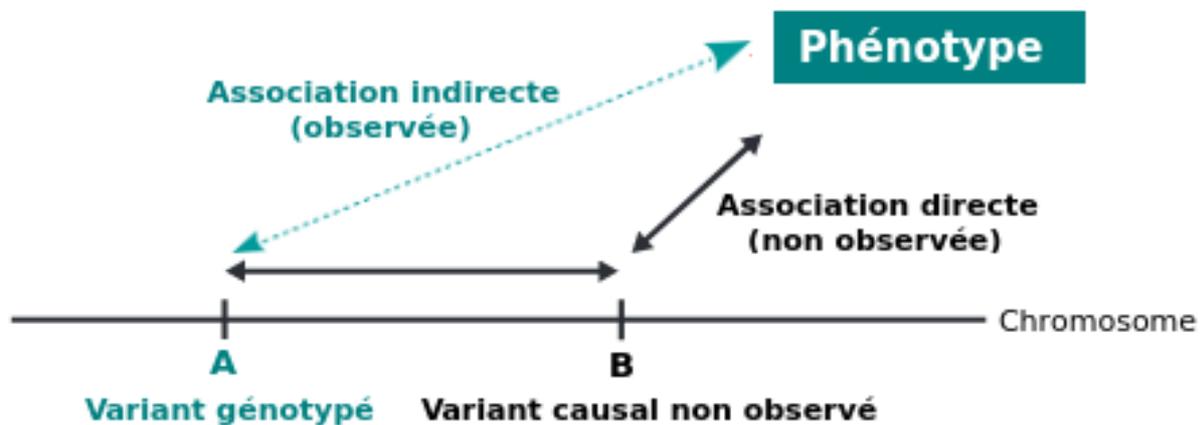


Fig. 26. Distinction entre association génétique et relation causale dans les études d'association génétique. Un variant génotypé statistiquement associé à un phénotype donné, n'est pas forcément un variant causal. En effet, le signal d'association détecté pour ce variant peut être dû à un déséquilibre de liaison avec le variant causal non-génotypé. Certaines localisations des variants génétiques peuvent être en faveur d'un rôle fonctionnel : dans une séquence régulatrice, dans une séquence codante dans le cas d'une mutation «non-synonyme» (c-à-d modifiant l'acide aminé) ou « non-sens » (c-à-d induisant la survenue prématurée d'un codon stop), dans un site d'épissage intronique ; dans ce cas seules des données expérimentales permettant de caractériser le rôle fonctionnel du variant pourront indiquer si ce SNP est le variant causal ; ce que nous indique les résultats expérimentaux obtenus le variant *NCR3-412*.

RESEARCH ARTICLE

Beyond genome-wide scan: Association of a cis-regulatory *NCR3* variant with mild malaria in a population living in the Republic of Congo

Sabrina Baaklini^{1,2}, Sarwat Afridi^{1,2^{‡a}}, Thy Ngoc Nguyen^{1,2^{‡b}}, Felix Koukouikila-Koussounda^{3,4}, Mathieu Ndounga⁵, Jean Imbert^{1,2}, Magali Torres^{1,2}, Lydie Pradel^{1,2}, Francine Ntoumi^{3,4,6}, Pascal Rihet^{1,2*}

1 INSERM, UMR1090 TAGC, Marseille, France, **2** Aix-Marseille Université, Marseille, France, **3** Fondation Congolaise pour la Recherche Médicale (FCRM), Villa D6, Cité OMS AFRO, Brazzaville, République du Congo, **4** Faculté des Sciences et Techniques, Université Marien Ngouabi, Brazzaville, République du Congo, **5** Unité de Recherche sur le Paludisme, Centre d'Etudes sur les Ressources Végétales (CERVE), Brazzaville, République du Congo, **6** Institute for Tropical Medicine, University of Tübingen, Tübingen, Germany

^{‡a} Current address: Balochistan University of Information Technology, Engineering and Management Sciences, Quetta, Pakistan

^{‡b} Current address: University of Science and Technology of Hanoi (USTH), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), Hanoi, Vietnam

* pascal.rihet@univ-amu.fr



 OPEN ACCESS

Citation: Baaklini S, Afridi S, Nguyen TN, Koukouikila-Koussounda F, Ndounga M, Imbert J, et al. (2017) Beyond genome-wide scan: Association of a cis-regulatory *NCR3* variant with mild malaria in a population living in the Republic of Congo. PLoS ONE 12(11): e0187818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187818>

Editor: Claudio Romero Farias Marinho, Universidade de Sao Paulo Instituto de Ciencias Biomedicas, BRAZIL

Received: July 27, 2017

Accepted: October 26, 2017

Published: November 9, 2017

Copyright: © 2017 Baaklini et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data are included in [S1 Table](#) (supporting information).

Funding: This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and Aix-Marseille University. SB, SA and TNN were supported by a PhD fellowship from the French ministry of research and technology, the Higher Education Commission from Pakistan, and the Vietnamese government, respectively. FKK, MD

Abstract

Linkage studies have revealed a linkage of mild malaria to chromosome 6p21 that contains the *NCR3* gene encoding a natural killer cell receptor, whereas *NCR3-412G>C* (rs2736191) located in its promoter region was found to be associated with malaria in Burkina Faso. Here we confirmed the association of rs2736191 with mild malaria in a Congolese cohort and investigated its potential cis-regulatory effect. Luciferase assay results indicated that rs2736191-G allele had a significantly increased promoter activity compared to rs2736191-C allele. Furthermore, EMSAs demonstrated an altered binding of two nuclear protein complexes to the rs2736191-C allele in comparison to rs2736191-G allele. Finally, after *in silico* identification of transcription factor candidates, pull-down western blot experiments confirmed that both STAT4 and RUNX3 bind the region encompassing rs2736191 with a higher affinity for the G allele. To our knowledge, this is the first report that explored the functional role of rs2736191. These results support the hypothesis that genetic variation within natural killer cell receptors alters malaria resistance in humans.

Introduction

Malaria caused by *Plasmodium falciparum* parasites remains a major global public health problem with 212 million new cases and 429 000 deaths in 2015 according to the WHO [1]. Sub-Saharan Africa accounted for most of these new cases and deaths (nearly 90%).

The contribution of host genetic variants to susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria has been widely studied since the discovery of the protective role of sickle cell

and FN are members of the Central African Network on Tuberculosis, HIV/AIDS and Malaria, CANTAM, supported by EDCTP. The funding body had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

mutation against malaria [2–4]. Indeed, malaria parasites have exerted strong selective pressure on the human genome in endemic areas, leading to the progressive accumulation of genetic adaptations in these populations [5]. Linkage and association studies have reported several associations between polymorphisms of candidate loci and various malaria-related phenotypes [6]. These phenotypes, which characterize malaria severity, include high parasitaemia, fever, anaemia and cerebral malaria.

Several linkage analyses conducted in different African ethnic groups provided evidence of linkage between the 6p21 locus and mild malaria [7–9]. In addition, several polymorphisms found under the linkage peak, and more precisely, within *TNF*, *LTA* and *NCR3* genes, were independently associated with subphenotypes of mild malaria such as parasitaemia or mild malaria attack in Burkina Faso [10–12]. Among those, several *TNF* and *LTA* polymorphisms have been characterized as cis-regulatory polymorphisms [13–18]. However, the functional effect of the polymorphism located within the promoter of *NCR3* gene (*NCR3-412G>C*, rs2736191), which encodes NKp30 receptor, was unknown.

The natural cytotoxicity receptor NKp30 (natural cytotoxicity triggering receptor 3, *NCR3*) has been identified to trigger NK-cell-mediated killing of several tumor cell lines [19], virus-infected cells [20], fungal cells [21], and also dendritic cells [22,23]. In patients with acute myeloid leukaemia, down-regulation of NKp30 expression has been shown to correlate with a decreased NK cells cytotoxicity [24]. Several studies provided evidences that NK cells directly and specifically interact with infected erythrocytes [25–27] resulting in their killing through cytotoxic activity [28–32] and this lysis may be triggered by the recognition of ligands expressed on parasitized RBC surface by NK cell receptors, among them NKp30 receptor [30,33]. Besides, NKp30 engagement at the NK cell surface can lead to the production of IFN γ , which has been shown to correlate with a reduced risk of mild malaria [34,35]. Therefore, polymorphisms that reduce NKp30 expression may increase the risk of mild malaria. Also, we hypothesized that the rs2736191-C allele associated with mild malaria in Burkina Faso binds less efficiently transcription factors recruited to the promoter, and that it diminishes the expression of its target gene. Here we investigated the cis-regulatory effect of rs2736191, and its association with mild malaria in a population living in the Republic of Congo, where there are limited human genetic data in relation with infectious diseases [36].

Materials and methods

Subjects and phenotypes

The study subjects have resided in Kinsana, Mbouono and Ngoko, three suburban areas close to each other and located in Makélékélé, one of the seven districts of Brazzaville (Congo) [37]. Three hundred and seventeen individuals were recruited between April and June 2010 and followed up during one year. Blood samples were collected at Makélékélé health division, which is located at 6km from the study area in the centre of the district; a written informed consent signed by the parents or legal guardians was obtained for the children. In this area, malaria is transmitted throughout the year with *P. falciparum* being the predominant species and *Anopheles gambiae* the main mosquito vector [38,39]. All the recruited individuals belonged to Bantu ethnicity, and were aged from one to nine years. Age mean was 4.34 (SD = 2.55), and sex ratio was 1.13 (167 Male and 148 Female). During the study period, if a child presented any symptoms related to clinical malaria, he was examined at the health center and treated in case of malaria episode (positive thick, thin blood smears and axillary temperature $\geq 37.5^\circ\text{C}$). Thick and thin blood smears were independently read by at least two trained biologists. The slides were read using an oil immersion lens at a 100x magnification. A slide was considered negative when no asexual parasite was observed after reading at least 100 thick fields. For positive

results, asexual parasites were counted against at least 200 leucocytes and expressed as the number of asexual parasites per μl , assuming 8,000 leucocytes/ μl of blood. The children who experienced at least one clinical malaria attack were classified in a group as mild malaria, whereas the children without any reported mild malaria episode in spite of the carriage of parasites during the follow-up period were considered as asymptomatic, as and were classified in a group as asymptomatic children. This led to determine a binary mild malaria phenotype. In addition, the number of malaria episodes was registered, and was considered as another phenotype. The ethical approval was given by the Institutional Ethics Committee for Research on Health Sciences of the Republic of Congo.

DNA extraction and rs2736191 genotyping

Genomic DNA was extracted from 200 μl of peripheral whole blood samples from patients and asymptomatic individuals using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany); DNA samples were then amplified by Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification kit (GE Healthcare Life Sciences, Velizy-Villacoublay, France) following the manufacturer's instructions. PCR amplification of DNA fragments containing rs2736191 with forward (5'-GATGGGTCTGGGTACTGGTG-3') and reverse (5'-GGGATCTGAGCAGTGAGGTC-3') primers was described by Delahaye *et al.* [10]. For RFLP analysis, the PCR product of rs2736191 was digested with 10 units of PfoI restriction endonuclease (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 37°C overnight. The digestion products were loaded on to Agilent DNA 1000 chips and analyzed on the 2100 Bioanalyzer, per manufacturer's instructions. Validation of the PCR-RFLP method was assessed by sequencing 37 PCR products of rs2736191 (corresponding to 37 individuals) on a Beckman coulter CEQ 8800 sequencer according to manufacturer's protocol (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Three hundred and fifteen DNA samples of the 317 samples were successfully genotyped (S1 Table).

Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium was tested and allelic frequencies were calculated, as described [40]. To estimate the association of rs2736191 polymorphism with the binary mild malaria phenotype, we used a chi-square test. We further performed a logistic regression analysis to evaluate the odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CIs). Moreover, we assessed the association of the investigated SNP with the number of episodes by a Kruskal and Goodman's gamma test and the Poisson regression method. To assess the effect of the SNP on the promoter activity, Student's t-test was used after checking the normality of the distributions by using the Shapiro-Wilk method and their variance equality by using a Fisher test. All analyses were performed by using either R or SPSS software (SPSS, Boulogne, France). Only terms significant at the 5% level were retained.

NCR3 linkage disequilibrium analyzes

To evaluate the linkage disequilibrium status of the region where rs2736191 is located, we explored the 1000 Genome Project data [41] for the Yoruba population through Ensembl browser [42].

Cell culture

Human NK92 cells (ATCC, Manassas, VA, USA, ATCC® CRL-2407™) were cultured in alpha MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 12.5% horse serum, 12.5% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 1.5 g/l sodium bicarbonate, 0.2 mM

inositol, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 0.02 mM folic acid and 100 U/ml recombinant IL-2 (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA). K-562 cells (ATCC® CLL-243™) were grown in Gibco® RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum.

Luciferase assay

A 663bp DNA fragment upstream the *NCR3* translation start site (chromosome 6: 31592727–31593389 according to the hg38 assembly) was cloned by “Sticky end PCR Cloning” method. Briefly, two PCR were performed on human gDNA from NK92 cell line using Herculase II Fusion enzyme (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, cat# 600679): PCR1 with the forward primer (CGCGTACCCAACCAACACACA) and the reverse primer (GAAGATGTCCAGTTGGCGA), and PCR2 with the forward primer (TACCCAACCAACACACACA) and the reverse primer (TCGAGAAGATGTCCAGTTG). The PCR products from PCR1 and PCR2 were mixed and hybridized together to create a 663bp DNA fragment with XhoI and MluI sticky end. This fragment was cloned into the MluI-XhoI sites of pGL3-Enhancer Vector (Promega, Madison, WI, USA, cat# E1771), which contained the firefly luciferase coding sequence. Initially, the pGL3 construct obtained, presented the G allele of rs2736191. To obtain the pGL3 construct containing the rs2736191-C allele, site-directed mutagenesis using the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA, cat#E0554S) was performed with primers designed by NEBaseChanger tool provided by the supplier (forward: AGGGCTCCTGcAGGCTTGTTC, reverse: CCTTGGCCCAGAAGCTAAC, annealing temperature: 67°C). K562 transfection was performed with Neon™ Transfection System (Invitrogen) following constructor instructions. For each out of the 6 tests performed, 10⁶ cells were co-transfected with 1 µg of control vector (empty pGL3-Enhancer vector) or with 1µg of tested construction (pGL3-Enhancer vector containing the rs2736191-G (p-G) or rs2736191-C (p-C) *NCR3* promoter) and 200ng of pRL-SV40 (a plasmid encoding Renilla luciferase from Promega), which was used as a transfection efficiency control. Transfected cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ during 24h. Firefly and Renilla luciferase values were obtained by analyzing 20µl of cell lysate according to standard instructions provided in the Dual Luciferase Kit (Promega cat# E1910) in a TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader (Berthold technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The firefly luciferase activity of each sample was normalized by Renilla luciferase activity and adjusted by pGL3-enhancer mean activity.

Electrophoretic mobility shift assay

NK92 nuclear extracts were prepared with the NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Oligonucleotides were designed based on the genomic sequence surrounding rs2736191; the SNP position is shown in bold: 5'-biotin- GGAGGGCTCCTGG/CAGGCTGTCTCTGG. All oligonucleotides were ordered from Eurofins (Eurofins, Strasbourg, France). We performed gel mobility shift assays with the LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. For competition assays, 200 or 400-fold excess unlabelled double-stranded variant oligonucleotides were incubated with the extracts (23°C, 30 min) before probe addition. Bound complexes were separated on 6% polyacrylamide gels and blotted onto membrane. The blot was processed with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate-based detection method.

In-silico identification of transcription factors candidates

An in silico prediction of transcription factor (TFs) candidates was performed using ReMap [43] and ENCODE catalogs of ChIP-seq peaks in lymphocyte cells. To detect a co-localization between these transcription factors binding sites and SNPs, we visualized the TFs ChIP-seq peaks in the UCSC Genome browser [44]. Then, to select TFs candidates, for which the peak of ChIP-seq co-localized with the SNP of interest we retained those with the maximum signal represented in black in the UCSC genome browser for the ENCODE catalog [45]. In the case of ReMap catalogs (2013 unpublished and [43]), we retained all the TFs, for which the peak of ChIP-seq co-localized with the SNP.

DNA pulldown and Western blot assays

DNA pulldown assay was performed as described previously [46]. Briefly, complementary TEG-biotinylated oligonucleotides encompassing the rs2736191-G/C binding site, GGAGGGC TCCTGG/CAGGCTTGTCTGG (the critical SNP is in bold), were annealed to form dsDNA. TEG-biotinylated dsDNA (2 µg) was conjugated to 100 µl streptavidin-bound magnetic beads (Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Dynabeads, M280; *Dynal*) in binding/washing buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA, and 0.1 M NaCl) for 30 min at room temperature. Conjugated DNA was collected with a magnetic particle concentrator. DNA-conjugated beads were then blocked with 0.5% BSA in TGEDN buffer (120 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 1 mM DTT, 0.1% Triton X-100, and 10% glycerol) at room temperature for 1 h. Beads were washed in TGEDN buffer and resuspended in 50 µl TGEDN. Ten-microliter beads conjugated to 2 µg DNA were equilibrated with TGEDN buffer and incubated with 500 µg NK92 nuclear extracts and 20 µg herring sperm DNA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) at 4°C overnight. Beads were washed in TGEDN buffer, and bound materials were eluted in 20 µl of the same buffer supplemented with 0.5% SDS and 1 M NaCl.

The eluted proteins were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred electrophoretically to a PVDF membrane. The membrane was then blocked in a 5% nonfat dry milk/Tris-buffered solution and incubated with primary antibody overnight. For STAT4, STAT5A, STAT5B detection a 1:250 dilution of an anti-STAT4 rabbit polyclonal antibody (sc-489, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA), anti-STAT5A rabbit polyclonal antibody (sc-1081, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, Texas, USA), or an anti-STAT5B mouse monoclonal antibody (sc-1656, Santa Cruz Biotechnology Inc.) was used. For STAT3 and EGR1 detection, a 1:500 dilution of an anti-STAT3 mouse monoclonal antibody (sc-8059, Santa Cruz Biotechnology Inc.) or an anti-EGR1 rabbit polyclonal antibody (sc-189, Santa Cruz Biotechnology Inc.) was used. And for RUNX3 detection a 1:1000 dilution of an anti-RUNX3 mouse monoclonal antibody was used (ab40278, Abcam, Cambridge, UK). The unbound primary antibody was removed by washing the membrane with 0.1% Tween/Tris-buffered solution, followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody diluted at 1:10000 in 0.5% nonfat dry milk/Tween/Tris-buffered solution. Proteins were visualized using ECL (GE Healthcare Life Science, Velizy-Villacoublay, France).

Results

Association of rs2736191 with mild malaria and the number of episodes

Three hundred and fifteen individuals were successfully genotyped. The observed genotype frequencies conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.5086$). The allelic frequencies for the rs2736191-G and rs2736191-C alleles were 0.73 and 0.27, respectively.

Table 1. Clinical data of individuals for rs2736191 polymorphism.

Genotype	Unaffected Individuals	Affected Individuals	Total
GG	83 (61.1%)	85 (48%)	168 (53.3%)
GC	43 (31.2%)	78 (44%)	121 (38.4%)
CC	12 (8.7%)	14 (8%)	26 (8.3%)
Total	138 (100%)	177 (100%)	315 (100%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187818.t001>

To assess the association of rs2736191 polymorphism with mild malaria in the study population, we performed a Chi-square test with 1df and a logistic regression analysis. We further evaluated the odds ratios and their 95% confidence intervals. Among the 315 individuals genotyped, 176 presented at least one malaria attack during the study (Table 1). We found that carriers of the rs2736191-C allele had a significantly higher risk of mild malaria attack without age as a covariate ($P = 0.033$), and with age as a covariate ($P = 0.029$) (Table 2). We further looked at the age distribution in the study population. Fifty-three % of the individuals were under 5 years old (Table 3). Thus, we splitted the population into two groups (subjects under 5 years and subjects over 5 years), and tested an interaction between Age and rs2736191. There was a significant interaction ($P = 0.001$; OR = 2.80, 95% confidence interval 1.53–5.12), indicating that subjects under 5 years and subjects over 5 years differed in the effect of rs2736191. Thus, we conducted an analysis after stratifying individuals by age categories. For the over-5 sub-population, there was a significant association between the rs2736191-C allele and mild malaria attack with a better p-value ($P = 0.008$) (Table 2), whereas there was no longer an association for the under-5 sub-population.

Furthermore, we tested the correlation between rs2736191 genotype and the number of mild malaria episodes (Tables 4, and S2 and S3 Tables) using Kruskal and Goodman’s gamma test. We found that rs2736191-C allele was significantly associated with an increased number of episodes ($P = 0.036$). In addition, we used the Poisson regression to assess the correlation between rs2736191 genotype and the number of mild malaria episodes, after taking into account age. The association was no longer significant ($P = 0.087$). We also performed an analysis after stratifying by age categories (<5 years and ≥ 5 years) and detected a significant association between the rs2736191-C carriage and an increased number of episode in the over-5 sub-population ($P = 0.006$), whereas there was no longer an association for the under-5 sub-population ($P = 0.69$). We confirmed the association of rs2736191 with the number of mild malaria episodes for the over-5 sub-population by using the Poisson regression when taking into account age ($P = 0.020$).

Table 2. Association tests of rs2736191 with mild malaria.

	Whole study population			Individuals < 5 ^a			Individuals ≥ 5 ^b		
	P	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P	OR	95%CI
Univariate analysis ^c	0.033	1.63	1.04–2.56	0.59	1.18	0.65–2.16	0.008	2.59	1.28–5.25
Multivariate analysis ^d	0.029	1.67	1.05–2.63	0.52	1.22	0.66–2.27	0.009	2.57	1.27–5.20

^a Children under 5 years of age

^b Children over 5 years of age

^c Assuming a dominant model (GG vs. GC+CC), p-values and Odd ratios were calculated according to logistic regression test for the affected/unaffected phenotype without age as a covariate

^d Assuming a dominant model (GG vs. GC+CC), p-values and Odd ratios were calculated according to logistic regression test for the affected/unaffected phenotype; the logistic model included age as a covariate

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187818.t002>

Table 3. Repartition of rs2736191 polymorphism in the study population according to age.

Genotype	Study population		
	Age < 5	Age ≥ 5	Total
GG	89 (52.7%)	79 (54.1%)	168 (53.3%)
GC	63 (37.3%)	58 (39.7%)	121 (38.41%)
CC	17 (10%)	9 (6.2%)	26 (8.3%)
Total	169 (100%)	146 (100%)	315 (100%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187818.t003>

rs2736191 affects NCR3 expression

To examine whether the rs2736191 G>C affects NCR3 promoter activity; we performed six gene reporter assays in K-562 cells. As shown in Fig 1, the transcriptional activity driven by the p-C construct containing the rs2736191-C allele decreased nearly by 37% compared with that driven by the p-G construct containing the rs2736191-G allele (P = 0.00762).

Effect of rs2736191 polymorphism on transcription factors binding to the promoter

The cis-regulatory effect of rs2736191 polymorphism on transcription factors binding was tested through an EMSA. Two major DNA-protein complexes were revealed, as shown in Fig 2. To assess if these 2 complexes bind specifically and preferentially one of the two variants, we performed competition assay with an increasing amount of non-labelled probes containing either the C or the G allele. Both complexes appeared to have a stronger affinity for the G allele as only the rs2736191-G unlabelled probe abolished very efficiently the binding of these complexes compared to the rs2736191-C unlabelled probe (Fig 2).

STAT4 and RUNX3 bindings are altered by rs2736191 polymorphism

An in silico prediction of transcription factor candidates using ReMap and Encode catalogs of ChIP-seq peaks in lymphocyte cells was performed and visualized in the UCSC Genome browser. We explore the co-localization of ChIP-seq peaks with rs2736191 and the SNPs in strong linkage disequilibrium with it. The SNP exhibiting the strongest linkage disequilibrium with rs2736191 was rs2256974 ($r^2 = 0.699$). Rs2256974 is located in a non-conserved region with neither DNaseI footprinting nor H3K27Ac mark co-localization and without evidence of transcription factors binding site, in contrast to rs2736191 polymorphism. Indeed, rs2736191 was co-localized with STATs family members (ReMap catalog) and SP1, RUNX3, EGR1, EBF1 (ENCODE catalog) transcription factors. As SP1 and EBF1 signals were quite low, we selected STATs family members, RUNX3 and EGR1 for further in vitro analysis.

Table 4. Proportion of mild malaria episodes according to rs2736191 polymorphism.

Genotype	Number of mild malaria episodes						Total
	0	1	2	3	4	5	
GG	83 (60.1%)	54 (49.6%)	16 (43.2%)	6 (37.5%)	7 (53.8%)	2 (100%)	168 (53.3%)
GC	43 (31.2%)	47 (43.1%)	21 (56.8%)	6 (37.5%)	4 (30.8%)	0 (0%)	121 (38.4%)
CC	12 (8.7%)	8 (7.3%)	0 (0%)	4 (25%)	2 (15.4%)	0 (0%)	26 (8.3%)
Total	138 (100%)	109 (100%)	37 (100%)	16 (100%)	13 (100%)	2 (100%)	315 (100%)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187818.t004>

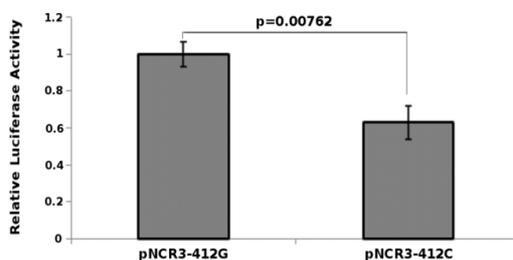
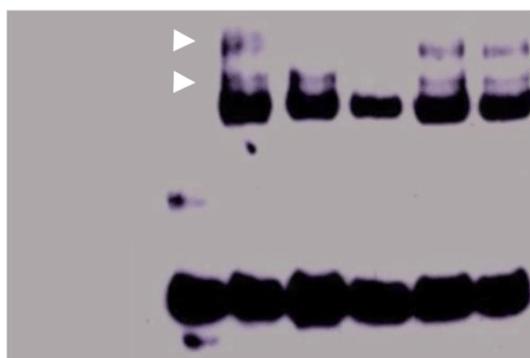


Fig 1. rs2736191 polymorphism affects NCR3 expression. Luciferase reporter gene assays with constructs containing the rs2736191-G (p-G) or rs2736191-C (p-C) NCR3 promoter in K-562 cell line. All constructs were co-transfected with pRL-SV40 to standardize transfection efficiency and luciferase activity for each sample was adjusted by the empty pGL3-Enhancer. Fold increase was measured by defining the activity of p-G vector as 1. Data shown are the means ± SE from 2 independent transfection experiments, each performed in triplicate. The rs2736191-G-containing NCR3 promoter drove significantly higher reporter gene expression (~37%) than the rs2736191C-containing NCR3 promoter ($P < 0.05$, as shown in the Figure). Statistical analysis was performed using two-tailed Student's t-test after controlling the normality of the data and the equality of their variance.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187818.g001>

Thus, we pulled-down NK92 nuclear proteins that bound a 26 bp double-stranded biotinylated probe containing either the rs2736191-C or rs2736191-G variant using streptavidin-magnetic beads. We further analyzed the bound proteins by performing a western-blot with antibodies directed against STATs, RUNX3 and EGR1.

We did not observe a binding of STAT3, STAT5A, STAT5B and EGR1 transcription factors to the sequence containing the rs2736191 polymorphism (data not shown). In contrast, we evidenced that RUNX3 and STAT4 bound the sequence containing the rs2736191 polymorphism, and that the binding to the one presenting the G allele was stronger when compared to the one presenting the C allele (Fig 3).



NCR3-412G probe	+	+	+	+	+	+
NK92 Nuclear Extract	-	+	+	+	+	+
NCR3-412G Competitor	-	-	++	+++	-	-
NCR3-412C Competitor	-	-	-	-	++	+++

Fig 2. Effect of rs2736191 polymorphism on transcription factors binding. EMSA with biotin-labelled probes containing the G allele of rs2736191 and incubated with NK92 nuclear extracts. Competition was performed with 200x (lane 3 and 5) or 400x (lane 4 and 6) excess of double-stranded DNA containing either the G or the C variants. Two arrows indicate two specific nuclear proteins that interact with rs2736191-G probe. The G variant was more effective in competing these two nuclear proteins compared to the C variant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187818.g002>

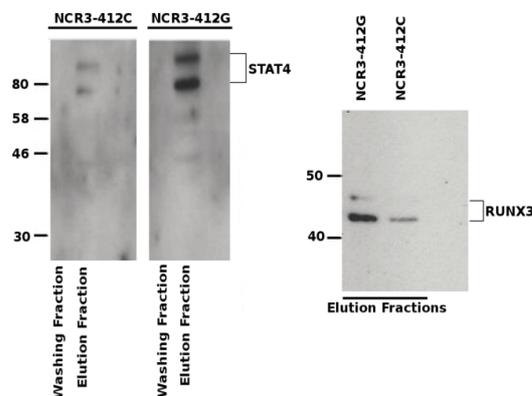


Fig 3. Differential binding of transcription factor candidates to rs2736191 polymorphism. DNA pull-down assay was performed with nuclear extracts prepared from NK92 cells and complementary biotinylated oligonucleotides encompassing the rs2736191-G/C binding sites. After the incubation, the nuclear protein bound were isolated using magnetic beads coupled with streptavidin and subjected to 12% SDS-PAGE and Western blotting for the transcription factors STAT4 and RUNX3. The strongest intensity obtained with the G probe, for both STAT4 and RUNX3, suggests a preferential binding of these transcription factors in presence of this allele compared to the rs2736191-C allele.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187818.g003>

Discussion

We have previously evidenced a genome-wide significant linkage of mild malaria with chromosome 6p21, which contains *NCR3* encoding for the Nkp30 receptor [7], and detected a genetic association between rs2736191 polymorphism (located in *NCR3* promoter region) and mild malaria in the same Burkinabe population [10]. The location of the SNP within the promoter suggested that this SNP is a *cis*-regulatory variant controlling *NCR3* expression. In this study, we thus evaluated the association between rs2736191 and mild malaria in a Congolese cohort and assessed its *cis*-regulatory effect.

We found that rs2736191-C carriers had a significant increased number of mild malaria episodes compared to the non-carriers. In the case of the affected vs. unaffected phenotype, the multivariate logistic regression analysis revealed that, as well as the study in Burkina Faso [10], rs2736191 polymorphism was significantly associated with the uncomplicated form of malaria. It should be stressed, nevertheless, that the present study in Congo was based on a passive follow up, whereas the study in Burkina Faso was based on an active follow-up; also, the passive follow-up can be considered a limit of the present study. In spite of this limit, the odds ratio obtained for the over-5 population was very close to the odd-ratio obtained in the Burkinabe population (OR = 2.59 and OR = 2.93, respectively), which was mainly composed of children over-5 years of age.

Luciferase assays performed in K-562 cells expressing *NCR3* mRNA [47] further supported a functional role of this SNP. Indeed, we observed that the p-G construct presenting rs2736191-G allele had a 37% increased promoter activity compared to the p-C construct presenting rs2736191-C allele. Furthermore, gel shift experiments, performed with NK92 nuclear protein extracts, showed an increased binding affinity of the rs2736191-G allele to two nuclear protein complexes compared to the rs2736191-C allele.

On the basis of bioinformatic analyses, we identified several transcription factor candidates corresponding to these complexes. Furthermore, pull-down western-blot experiment confirmed that both STAT4 and RUNX3 bound the region encompassing rs2736191 with a higher affinity for the G allele. STAT4 is essential for IL-12 mediated cytotoxicity and IFN γ production in

mouse and human NK cells [48] and a direct binding to perforin promoter has already been reported in human NK cells [49]. Concerning RUNX3 transcription factor, it is highly expressed in natural killer cells [50] but few is known about its function in these cells. Nevertheless, Levanon *et al.* have shown that, in mice, RUNX3 cooperation with ETS and T-box transcription factors regulates the interleukin-15-mediated transcription program during activation of Natural Killer cells [51]. Most of the time, the three NCR1, NCR2, and NCR3 were shown to be co-expressed, suggesting a co-regulation of the three NCRs, whereas a reduced expression of the three NCRs has been associated with impaired NK cytolytic function [52,53]. Moreover, RUNX3 has been shown to also regulate NCR1 expression [54] and ETS-1 transcription factor was also shown to bind to a specific and common region in the NCRs promoters [55]. Our results further support that RUNX3 can be one of these key regulatory factors that sustain the coordinated regulation of three NCRs.

The role of NK cells in malaria has been extensively investigated evoking either their cytokine production function [27,56,57] or their cytotoxic response to infected red blood cells [28–33]. According to Mavoungou *et al.* [30,33], the mechanism underlying NK cells cytotoxicity in *Plasmodium falciparum* malaria, is the recognition of the DBL1 α domain of the parasitic antigen PfEMP1 by the NKp30 activating receptor, resulting in parasitized red blood cells lysis. All together these results support the biological model involving NKp30 receptor in the cytotoxic response to parasitized RBC. However, NK cell receptors and infected RBC ligands leading to this cytotoxic response remains controversial. Indeed, PfEMP1 that is known to bind several other molecules such as ICAM-1, complement receptor 1 (CR1), heparan sulfate (HS), chondroitin sulfate A (CSA) and CD36 [58], have failed to activate NK cell cytotoxicity in other studies [26,59]. Nevertheless, in the first study the authors tested the interaction between PfEMP1 and CSA, while in the second study, authors have looked for NK cytotoxicity markers after 6 hours of co-culture with either infected red blood cells (iRBC) expressing PfEMP1 or iRBC not expressing PfEMP1 arguing that the ligand density of native PfEMP1 on the surface of iRBC is not enough to activate NK cells cytotoxicity compared to *in vitro* high concentration of peptidic DBL-1 α as proposed by Mavoungou *et al.* [33]. Though, because of its binding abilities with various receptors, its diversity and its variable density on iRBC [60,61], involvement of PfEMP1 and its interactors on NK cells surface merits further investigation.

Besides, other ligands and receptors have been proposed to be involved in the cytotoxic response of NK cells, among them, Hsp70, which is a “self” stress ligand [62] or LFA-1, which is a molecule essential for stable contact with target cells [29,63]. As triggering of at least two activating receptors is essential for efficient NK cells cytotoxicity and cytokine release [64], a synergistic effect also suggested by Mavoungou *et al.* [33] in a malarial context, these results do not seem contradictory. However, this synergistic activation requires further investigation.

In conclusion, we replicated and extended the association of rs2736191 with mild malaria in an independent population living in Central Africa. Moreover, we evidenced its effect on the promoter activity and on the binding of nuclear proteins, including transcription factors, such as STAT4 and RUNX3. These results support the hypothesis that rs2736191 alters the activation of NK cells, and thus influences human malaria resistance.

Supporting information

S1 Table. Phenotype and genotype data set.

(PDF)

S2 Table. Proportion of mild malaria episodes according to rs2736191 for children under 5 years.

(PDF)

S3 Table. Proportion of mild malaria episodes according to rs2736191 for children over 5 years.
(PDF)

Acknowledgments

We thank all the individuals for participating in the study. We thank Laurence Zitvogel and Nicolas Delahaye for help with promoter cloning, Regis Costello and Celine Baier for helpful discussions, and Laurence Borge for assistance and the use of the cell culture facility (CRCM U1068, Marseille).

Author Contributions

Conceptualization: Pascal Rihet.

Data curation: Sabrina Baaklini, Sarwat Afridi, Thy Ngoc Nguyen, Felix Koukouikila-Koussounda, Mathieu Ndounga, Francine Ntoumi, Pascal Rihet.

Formal analysis: Sabrina Baaklini, Jean Imbert.

Funding acquisition: Mathieu Ndounga, Francine Ntoumi, Pascal Rihet.

Investigation: Sabrina Baaklini, Sarwat Afridi, Thy Ngoc Nguyen, Magali Torres, Lydie Pradel, Pascal Rihet.

Methodology: Sabrina Baaklini, Sarwat Afridi, Thy Ngoc Nguyen, Jean Imbert, Magali Torres, Lydie Pradel.

Resources: Felix Koukouikila-Koussounda, Mathieu Ndounga, Francine Ntoumi.

Supervision: Pascal Rihet.

Validation: Sarwat Afridi, Thy Ngoc Nguyen, Pascal Rihet.

Writing – original draft: Sabrina Baaklini, Pascal Rihet.

Writing – review & editing: Sabrina Baaklini, Sarwat Afridi, Thy Ngoc Nguyen, Felix Koukouikila-Koussounda, Mathieu Ndounga, Jean Imbert, Magali Torres, Lydie Pradel, Francine Ntoumi, Pascal Rihet.

References

1. World Health Organization. World Malaria Report 2015. World Health Organization; 2016.
2. Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, et al. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*. 1991; 352: 595–600. <https://doi.org/10.1038/352595a0> PMID: 1865923
3. Allison AC. Protection Afforded by Sickle-cell Trait Against Subtertian Malarial Infection. *BMJ*. 1954; 1: 290–294. PMID: 13115700
4. Ackerman H, Usen S, Jallow M, Sisay-Joof F, Pinder M, Kwiatkowski DP. A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria. *Ann Hum Genet*. 2005; 69: 559–565. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00180.x> PMID: 16138914
5. Kwiatkowski DP. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *Am J Hum Genet*. 2005; 77: 171–192. <https://doi.org/10.1086/432519> PMID: 16001361
6. Hill AV. Genetics and genomics of infectious disease susceptibility. *Br Med Bull*. 1999; 55: 401–413. PMID: 10723865
7. Brisebarre A, Kumulungui B, Sawadogo S, Atkinson A, Garnier S, Fumoux F, et al. A genome scan for *Plasmodium falciparum* malaria identifies quantitative trait loci on chromosomes 5q31, 6p21.3, 17p12, and 19p13. *Malar J*. 2014; 13: 198. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-198> PMID: 24884991

8. Jepson A, Sisay-Joof F, Banya W, Hassan-King M, Frodsham A, Bennett S, et al. Genetic linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in Gambian children: study of affected sibling pairs. *BMJ*. 1997; 315: 96–97. PMID: [9240049](#)
9. Flori L, Sawadogo S, Esnault C, Delahaye NF, Fumoux F, Rihet P. Linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in families living in Burkina Faso. *Hum Mol Genet*. 2003; 12: 375–378. PMID: [12566384](#)
10. Delahaye NF, Barbier M, Fumoux F, Rihet P. Association analyses of NCR3 polymorphisms with *P. falciparum* mild malaria. *Microbes Infect*. 2007; 9: 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.11.002> PMID: [17208487](#)
11. Barbier M, Delahaye NF, Fumoux F, Rihet P. Family-based association of a low producing lymphotoxin- α allele with reduced *Plasmodium falciparum* parasitemia. *Microbes Infect*. 2008; 10: 673–679. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.03.001> PMID: [18457972](#)
12. Flori L, Delahaye NF, Iraqi FA, Hernandez-Valladares M, Fumoux F, Rihet P. TNF as a malaria candidate gene: polymorphism-screening and family-based association analysis of mild malaria attack and parasitemia in Burkina Faso. *Genes Immun*. 2005; 6: 472–480. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364231> PMID: [15931230](#)
13. Kiss-Toth E, Harlock E, Lath D, Quertermous T, Wilkinson JM. A TNF variant that associates with susceptibility to musculoskeletal disease modulates thyroid hormone receptor binding to control promoter activation. *PLoS One*. 2013; 8: e76034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076034> PMID: [24069456](#)
14. Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. *Nat Genet*. 2003; 33: 469–475. <https://doi.org/10.1038/ng1124> PMID: [12627232](#)
15. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997; 34: 391–399. PMID: [9293772](#)
16. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94: 3195–3199. PMID: [9096369](#)
17. Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17: 1454–1462. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.80> PMID: [19471307](#)
18. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol*. 2000; 114: 1180–1183. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00001.x> PMID: [10844563](#)
19. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*. 1999; 190: 1505–1516. PMID: [10562324](#)
20. Golden-Mason L, Cox AL, Randall JA, Cheng L, Rosen HR. Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology*. 2010; 52: 1581–1589. <https://doi.org/10.1002/hep.23896> PMID: [20812318](#)
21. Li SS, Kyei SK, Timm-McCann M, Ogbomo H, Jones GJ, Shi M, et al. The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients. *Cell Host Microbe*. 2013; 14: 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.09.007> PMID: [24139398](#)
22. Simhadri VR, Reiners KS, Hansen HP, Topolar D, Simhadri VL, Nohroudi K, et al. Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One*. 2008; 3: e3377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003377> PMID: [18852879](#)
23. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Münz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*. 2002; 195: 343–351. <https://doi.org/10.1084/jem.20011149> PMID: [11828009](#)
24. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci M-J, Reviron D, et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002; 99: 3661–3667. PMID: [11986221](#)
25. Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, Davis DM, et al. Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*. 2003; 171: 5396–5405. PMID: [14607943](#)
26. Baratin M, Roetync S, Pouvelle B, Lemmers C, Viebig NK, Johansson S, et al. Dissection of the role of PfEMP1 and ICAM-1 in the sensing of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by natural killer cells. *PLoS One*. 2007; 2: e228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000228> PMID: [17311092](#)

27. Korbel DS, Newman KC, Almeida CR, Davis DM, Riley EM. Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol*. 2005; 175: 7466–7473. PMID: [16301654](#)
28. Hermsen CC, Konijnenberg Y, Mulder L, Loé C, Van Deuren M, Van Der Meer JWM, et al. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clinical & Experimental Immunology*. 2003; 132: 467–472.
29. Chen Q, Amaladoss A, Ye W, Liu M, Dummler S, Kong F, et al. Human natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111: 1479–1484.
30. Mavoungou E, Luty AJF, Kremsner PG. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. *Eur Cytokine Netw*. 2003; 14: 134–142. PMID: [14656686](#)
31. Orago AS, Facer CA. Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. *Clin Exp Immunol*. 1991; 86: 22–29. PMID: [1833100](#)
32. Bouyou-Akoté MK, Issifou S, Meye JF, Kombila M, Ngou-Milama E, Luty AJF, et al. Depressed natural killer cell cytotoxicity against *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes during first pregnancies. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: 342–347. <https://doi.org/10.1086/380646> PMID: [14727203](#)
33. Mavoungou E, Held J, Mewono L, Kremsner PG. A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *J Infect Dis*. 2007; 195: 1521–1531. <https://doi.org/10.1086/515579> PMID: [17436233](#)
34. Luty AJ, Lell B, Schmidt-Ott R, Lehman LG, Luckner D, Greve B, et al. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children. *J Infect Dis*. 1999; 179: 980–988. <https://doi.org/10.1086/314689> PMID: [10068595](#)
35. Dodo D, Omer FM, Todd J, Akanmori BD, Koram KA, Riley EM. 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: 971–979. <https://doi.org/10.1086/339408> PMID: [11920322](#)
36. Koukouikila-Koussounda F, Ntoumi F. Malaria epidemiological research in the Republic of Congo. *Malar J*. 2016; 15: 598. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1617-7> PMID: [28010728](#)
37. Koukouikila-Koussounda F, Ntoumi F, Ndounga M, Tong HV, Abena A-A, Velavan TP. Genetic evidence of regulatory gene variants of the STAT6, IL10R and FOXP3 locus as a susceptibility factor in uncomplicated malaria and parasitaemia in Congolese children. *Malar J*. 2013; 12: 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-9> PMID: [23297791](#)
38. Ndounga M, Pembe Issamou Mayengue, Casimiro PN, Koukouikila-Koussounda F, Bitemo M, Diassivi Matondo B, et al. Artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine for the treatment of acute uncomplicated malaria in Congolese children under 10 years old living in a suburban area: a randomized study. *Malar J*. 2015; 14: 423. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0918-6> PMID: [26511848](#)
39. Trape JF, Zoulani A. Malaria and urbanization in central Africa: the example of Brazzaville. Part II: Results of entomological surveys and epidemiological analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987; 81 Suppl 2: 10–18.
40. Rodríguez S, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*. 2009; 169: 505–514. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn359> PMID: [19126586](#)
41. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015; 526: 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393> PMID: [26432245](#)
42. Aken BL, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Bernsdorff F, Bhai J, et al. Ensembl 2017. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45: D635–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1104> PMID: [27899575](#)
43. Griffon A, Barbier Q, Dalino J, van Helden J, Spicuglia S, Ballester B. Integrative analysis of public ChIP-seq experiments reveals a complex multi-cell regulatory landscape. *Nucleic Acids Res*. 2015; 43: e27. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1280> PMID: [25477382](#)
44. Kent WJ. The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Res*. 2002; 12: 996–1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102> PMID: [12045153](#)
45. Rosenbloom KR, Sloan CA, Malladi VS, Dreszer TR, Learned K, Kirkup VM, et al. ENCODE data in the UCSC Genome Browser: year 5 update. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41: D56–63. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1172> PMID: [23193274](#)
46. Chung EY, Liu J, Zhang Y, Ma X. Differential expression in lupus-associated IL-10 promoter single-nucleotide polymorphisms is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Genes Immun*. 2007; 8: 577–589. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364420> PMID: [17703177](#)

47. Srivastava BIS, Srivastava MD. Expression of natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44, and NKp46 mRNAs and proteins by human hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Leuk Res.* 2006; 30: 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.06.020> PMID: 16061284
48. Wang KS, Frank DA, Ritz J. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood.* 2000; 95: 3183–3190. PMID: 10807786
49. Yamamoto K, Shibata F, Miyasaka N, Miura O. The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297: 1245–1252. PMID: 12372421
50. Ohno S-I, Sato T, Kohu K, Takeda K, Okumura K, Satake M, et al. Runx proteins are involved in regulation of CD122, Ly49 family and IFN-gamma expression during NK cell differentiation. *Int Immunol.* 2008; 20: 71–79. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm120> PMID: 18003603
51. Levanon D, Negreanu V, Lotem J, Bone KR, Brenner O, Leshkowitz D, et al. Transcription factor Runx3 regulates interleukin-15-dependent natural killer cell activation. *Mol Cell Biol.* 2014; 34: 1158–1169. <https://doi.org/10.1128/MCB.01202-13> PMID: 24421391
52. De Maria A, Fogli M, Costa P, Murdaca G, Puppo F, Mavilio D, et al. The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *Eur J Immunol.* 2003; 33: 2410–2418. <https://doi.org/10.1002/eji.200324141> PMID: 12938217
53. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, et al. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood.* 2007; 109: 323–330. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-027979> PMID: 16940427
54. Lai CB, Mager DL. Role of Runt-related Transcription Factor 3 (RUNX3) in Transcription Regulation of Natural Cytotoxicity Receptor 1 (NCR1/NKp46), an Activating Natural Killer (NK) Cell Receptor. *J Biol Chem.* 2012; 287: 7324–7334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.306936> PMID: 22253448
55. Venton G, Labiad Y, Colle J, Fino A, Afridi S, Torres M, et al. Natural killer cells in acute myeloid leukemia patients: from phenotype to transcriptomic analysis. *Immunol Res.* 2016; 64: 1225–1236. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8848-0> PMID: 27481509
56. Agudelo O, Bueno J, Villa A, Maestre A. High IFN-gamma and TNF production by peripheral NK cells of Colombian patients with different clinical presentation of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 2012; 11: 38. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-38> PMID: 22316273
57. Artavanis-Tsakonas K, Riley EM. Innate Immune Response to Malaria: Rapid Induction of IFN- from Human NK Cells by Live *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *The Journal of Immunology.* 2002; 169: 2956–2963. PMID: 12218109
58. Chen Q, Heddini A, Barragan A, Fernandez V, Pearce SF, Wahlgren M. The semiconserved head structure of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 mediates binding to multiple independent host receptors. *J Exp Med.* 2000; 192: 1–10. PMID: 10880521
59. D’Ombrain MC, Voss TS, Maier AG, Pearce JA, Hansen DS, Cowman AF, et al. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 specifically suppresses early production of host interferon-gamma. *Cell Host Microbe.* 2007; 2: 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.012> PMID: 18005727
60. Subramani R, Quadt K, Jeppesen AE, Hempel C, Petersen JEV, Hassenkam T, et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte knob density is linked to the PfEMP1 variant expressed. *MBio.* 2015; 6: e01456–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01456-15> PMID: 26443460
61. Quadt KA, Barfod L, Andersen D, Bruun J, Gyan B, Hassenkam T, et al. The density of knobs on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes depends on developmental age and varies among isolates. *PLoS One.* 2012; 7: e45658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045658> PMID: 23029166
62. Böttger E, Multhoff G, Kun JFJ, Esen M. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce granzyme B by NK cells through expression of host-Hsp70. *PLoS One.* 2012; 7: e33774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033774> PMID: 22438997
63. Urlaub D, Höfer K, Müller M-L, Watzl C. LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. *J Immunol.* 2017; 198: 1944–1951. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601004> PMID: 28100681
64. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood.* 2006; 107: 159–166. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1351> PMID: 16150947

Résultat 3 : Analyse d'association du variant NCR3 -412 avec les accès palustres graves dans une cohorte sénégalaise

Nous avons mis en évidence précédemment que le polymorphisme *NCR3-412* est non seulement associé aux accès palustres simples dans deux populations indépendantes mais qu'il a également une fonction cis-régulatrice contrôlant l'expression du récepteur NKp30 à la surface des cellules *Natural Killer* ce qui peut modifier la réponse immunitaire de ces cellules soit par une sur- / sous-production de cytokines pro-inflammatoires, soit par une activation plus ou moins efficace de la cytotoxicité.

Au vu des précédentes associations, du rôle cis-régulateur de *NCR3-412* et de l'importance de la réponse immunitaire médiée par les cellules NK face à l'infection palustre, nous nous sommes interrogés sur le rôle potentiel de ce polymorphisme dans les formes sévères du paludisme. Ainsi une étude cas-contrôle a été conduite dans une cohorte sénégalaise composée de 189 individus, dont 113 patients atteints de paludisme grave (86 cas de neuropaludisme et 27 cas graves non cérébral) et 76 patients atteints de paludisme simple, dans laquelle l'association du polymorphisme avec les différents phénotypes compliqués a été évalué, de même que l'association de différents paramètres cliniques. De plus, nous nous sommes intéressés à l'expression de NKp30 à la surface de NK d'individus sénégalais sains afin d'évaluer l'expression constitutive de ce récepteur dans la population sénégalaise.

Malheureusement, nous n'avons détecté aucune différence significative de la fréquence allélique de *NCR3-412* entre les individus atteints de formes simples et les individus atteints de formes compliqués (neuropaludisme, forme grave non cérébrale ou toutes formes graves confondues). Sur la base d'un effet correspondant à celui des études sur le paludisme simple au Burkina Faso et au Congo, les études de puissance ont révélé une puissance d'environ 85 %. Cela suggère que soit l'ampleur de l'effet est significativement plus faible pour le paludisme grave, soit qu'il n'y a pas d'association entre le SNP et le paludisme grave.

On peut s'interroger sur le manque de puissance dans le cas du paludisme sévère, d'autant plus que les résultats de cytométrie de flux montrent une expression constitutive de NKp30 à la surface des cellules NK élevée chez les

individus sains en comparaison aux populations caucasiennes. Dans ce cas, une augmentation de la taille de l'échantillon devrait permettre de détecter une association. On peut également émettre l'hypothèse d'une épistasie entre ce gène et d'autres gènes codant pour d'autres récepteurs cellulaires NK.

Néanmoins, nous avons confirmé une corrélation entre certains paramètres clinique et le paludisme sévère. Ainsi, nous avons détecté une réduction significative du nombre de plaquettes chez les patients atteints de paludisme sévère (cérébral ou non) ainsi qu'une augmentation significative du nombre de leucocytes chez les patients atteints de neuropaludisme par rapport à ceux atteints de paludisme non compliqué.

Association study of host factors with severe malaria in Senegalese patients

Running title: ***NCR3* in severe malaria**

Alassane Thiam¹, Sabrina Baaklini², Babacar Mbengue³, Samia Nisar², Maryam Diarra⁴, Sandrine Marquet², Mouhamadou Mansour Fall⁵, Michel Sanka², Fatou Thiam¹, Rokhaya Ndiaye Diallo¹, Magali Torres², Alioune Dieye^{1,3}, and Pascal Rihet^{2, §}

¹Unité d'Immunogénétique, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal

²Aix Marseille Univ, INSERM, TAGC, Marseille, France

³Service d'Immunologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal

⁴G4 biostatistique, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal

⁵Service de Réanimation, Hôpital Principal de Dakar, Sénégal

[§]Corresponding author

Email addresses:

AT : Alassane.Thiam@pasteur.sn

SB : sabrina.BAAKLINI@univ-amu.fr

BM : Babacar.Mbengue@pasteur.sn

SN : samia.biotech@yahoo.com

SM : sandrine.marquet@univ-amu.fr

MS : michel655@outlook.fr

MT : magali.torres@univ-amu.fr

MD : maryam.diarra@pasteur.sn

MMF : koubah2000@yahoo.fr

FT : fatou.thiam@pasteur.sn

RND : rokhaya9.ndiaye@ucad.edu.sn

AD : alioune.dieye@ucad.edu.sn

PR: pascal.rihet@univ-amu.fr

Summary

Background.

Host factors, including host genetic variation, have been shown to influence the outcome of *Plasmodium falciparum* infection. Genome-wide linkage studies have mapped mild malaria resistance genes on chromosome 6p21, whereas *NCR3* lying within this region was found to be associated with mild malaria.

Methods

Blood samples were taken from 188 *Plasmodium falciparum* malaria patients (76 mild malaria patients, 85 cerebral malaria patients, 27 severe non-cerebral malaria patients). *NCR3-412* polymorphism (rs2736191) was analysed by sequencing, and haematological parameters were measured. Finally, their association with clinical phenotypes was assessed.

Results

We set up a new study population to investigate the role of host factors in severe malaria in Senegal. Here we report an association of thrombocytopenia with both cerebral malaria and severe non-cerebral malaria on the one hand, and an association of high leukocyte count with cerebral malaria. Moreover, we considered *NCR3* as a candidate gene for severe malaria, and investigate its potential involvement in severe pathogenesis. There was an association of *NCR3* genotype with neither cerebral malaria nor severe non-cerebral malaria.

Conclusions

This suggests that *NCR3* genetic variation has no effect or a small effect on the occurrence of severe malaria, although it has been strongly associated with mild malaria. We discuss the biological meaning of these results. Besides, our results confirmed the association of thrombocytopenia and high leukocyte count with severe malaria phenotypes.

Keywords: *NCR3*; *Plasmodium falciparum*; mild malaria; severe malaria; population-based study, genetic association

Background

Plasmodium falciparum malaria remains a major problem of public health worldwide, with 212 million malaria cases occurred in 2015 [1]. The most severe forms of malaria caused by *P. falciparum* are cerebral malaria, severe anaemia, and respiratory distress [2]. According to the WHO report, the major complications account for 429,000 deaths annually, essentially in children, pregnant woman and immuno-suppressed individuals. It should be noticed, however, that approximately 2% of clinical attacks are severe [3], and that most of malarial infection cases are asymptomatic.

Host genetic factors have been shown to influence the outcome of infection [4, 5]. Genome scans have identified several human loci linked or associated with parasitaemia, mild malaria [6-8], or severe malaria [9-12]. Genome scans that have been performed in mice have also identified some loci, and some correspond to those genetically linked to parasitemia (Char 3 and Char 8) or cerebral malaria (Cmsc) in humans [4]. In addition, many candidate gene studies provided evidence of an association between human genetic variants and those phenotypes [4, 5, 13, 14]. Some genes have been found to be associated with both mild and severe forms of clinical malaria; these include *HBB*, *TNF* and *NOS2A*. Interestingly, *TNF* is located within chromosome 6p21.3 linked to parasitemia and mild malaria in humans, and the corresponding chromosomal region in mice is genetically linked to mild malaria and cerebral malaria [15-17].

NCR3 that is also located within chromosome 6p21.3 has been shown to be associated with mild malaria in Burkina Faso [18] and in Congo [19]. Both population-based and family-based studies showed that *NCR3-412C* carriers had more frequent mild malaria attacks than *NCR3-412GG* individuals. In addition, Baaklini et al. showed that *NCR3-412* (rs2736191) alters both the binding of transcription factors to the genomic sequence and the promoter activity. Besides, Mavoungou et al. reported that NKp30 encoded by *NCR3* is involved in the recognition of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells by natural killer (NK) cells [20]. Also, we hypothesize that *NCR3-412* alters

the expression of NKp30 at the NK cell surface and the response of NK cells to infected red blood cells.

Here we considered *NCR3* as a candidate gene for severe malaria. We genotyped *NCR3-412* (rs2736191) in DNA samples from patients with either mild malaria or severe malaria to assess its association with severe malaria phenotypes.

Methods

Patients and phenotypes

The study was performed between 2012 and 2015 in two Senegalese sites: at the Principal Hospital of Dakar and in the regional hospital of Tambacounda. Two categories of patients with clinical malaria namely, Severe Malaria (SM) and mild malaria (MM) patients were enrolled. For all patients, the presence of *P. falciparum* parasitemia was determined by microscopic examination of thin and thick smears, prior anti-malarial treatment. Clinical histories, data and basic demographic information, ethnic group, study questionnaires were recorded at baseline for each subject. At the day of admission, biological data including parasite density, haematology and biochemistry characteristics were determined by hospitals' medical laboratories and recorded. Briefly, thick and thin blood films were stained with 10% Giemsa solution for 15 minutes to measure parasitaemia. Parasite determination and measurement were established by two independent readings. The parasitaemia was defined as the number of parasitized erythrocytes observed per μl of blood. *P. falciparum* was the only *Plasmodium* species detected. Samples were taken at the admission before any treatment. An informed consent was obtained from each participant and/or their relatives prior to inclusion, after giving them written or verbal information in their native language. The protocols were approved by the investigator's institutions, the National Ethical Committee and the Ministry of Health of Senegal.

Two groups of SM patients were defined according to the neurological dysfunction, namely cerebral malaria cases (CM) and non CM (NCM) cases. CM cases were defined on the basis of a deep coma, an

unpurposeful response or no response to a painful stimulus by Glasgow score < 9, a microscopically diagnosed *P. falciparum* infection, without other clinically cause of impaired consciousness, such as hypoglycemia, meningitis, and encephalitis according to WHO criteria [21]. NCM cases were defined as severe malaria (SM) without neurological symptoms such as impaired consciousness, convulsions and long-term neurological deficits. NCM patients presented isolated symptoms of SM such as severe anaemia, hypoglycaemia, respiratory distress, or hypoxia. The NCM group consisted of 27 patients, whereas the CM group consisted of 85 patients. All these patients were managed by the same medical staff. The treatment protocol was based on the Senegalese national recommendations, which are intramuscular quinine 20mg/kg followed by 20mg/kg every 8 h. Patients were examined every 4 h for the first 24 h and every 6 h thereafter.

Regarding MM, a total of 76 patients who were treated at the outpatient clinic of the hospital were initially enrolled. Of these, 76 patients had fever with *P. falciparum* parasitaemia of <25000 parasites/ μ L of blood, with no evidence of impaired consciousness or seizures at the time of enrolment. Blood samples from MM patients were obtained on the day of hospital admission.

DNA extraction, genome amplification, and genotyping

Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions [22]. The total DNA samples were then amplified by IllustraGenomiPhi V2 DNA Amplification kit (GE Healthcare Life Sciences, France, Europe) using the following protocol: 1 μ l contains approximately 10 ng of genomic DNA was mixed with 9 μ l of Sample Buffer. The mixture was heated to 95°C for 3 minutes to denature genomic DNA and then cooled down to 4°C or incubated on ice. For DNA amplification, a master mix solution includes 9 μ l of Reaction Buffer and 1 μ l of Phi29 DNA polymerase enzyme mix was added directly in the sample. Sample were then incubated at 30°C for 1.5 hours and heated to 65°C for 10 minutes to inactivate the enzyme. The amplification product was diluted up to 1ml in total volume by pure water to reach DNA concentration of about 4-7 ng/ μ l and was stored at -20°C until use.

The primer pair to amplify DNA fragments containing *NCR3-412* (rs2736191) was designed as described [19]; PCR amplification of DNA fragments was performed with forward (5'-GATGGGTCTGGGTACTGGTG-3') and reverse (5'-GGGATCTGAGCAGTGAGGTC-3') primers. For Hemoglobin S (rs334) and hemoglobin C (rs33930165), the forward primer was 5'-CTGAGGGTTTGAAGTCCAAC-3', and the reverse one was 5'-CAGCATCAGGAGTGGACAG-3'. The PCR products were checked by 1.5% agarose gel electrophoresis to verify the product size and purified with the PCR DNA Purification Kit (QIAGEN). The purified PCR products were sent to the GATC company for sequencing using the Sanger method (GATC biotech, Germany).

Statistical analyses

Hardy-Weinberg equilibrium was tested and allelic frequencies were calculated, as described [23]. Other statistical tests were performed by using R or the SPSS software (SPSS, Boulogne, France). To assess the association of quantitative biological phenotypes and clinical phenotypes, we used the Kruskal-Wallis test and the Mann-whitney test. To estimate the association of rs2736191 polymorphism with the binary malaria phenotype, we conducted a chi-square test and a logistic regression analysis, and we evaluated the odds ratios (OR) and their 95% confidence intervals (CIs). All the tests were two-sided. G*power software was used to compute statistical power for the genetic association study.

Results

Association between biological parameters and severe malaria

Table 1 shows the characteristics of the patients. There was no effect of gender (Chi-square=2.4, df=2, P=0.3). CM patients had a higher risk of dying compared to NCM (P=0.04) or MM patients (P=2.0 10⁻⁶) by using a Fisher exact test. Moreover, there were significant differences between CM, NCM, and MM patients on the basis of the Kruskal-Wallis test for age (P=0.009), erythrocyte count (P=0.019), haematocrit (P=3.3 10⁻⁶), haemoglobin concentration (P=2.4 10⁻⁶), leucocyte count (P=0.006), and platelet count (P=7.9 10⁻⁴).

NCM patients were younger than CM and MM patients ($P < 0.006$) by using the Mann-Whitney method, whereas there was no difference between CM and MM for age. Erythrocyte count ($P = 0.01$), haematocrit ($P = 4.9 \times 10^{-6}$), and haemoglobin concentration ($P = 1.4 \times 10^{-6}$) of NCM patients were lower than those of MM patients. NCM patients showed a lower haematocrit ($P = 1.1 \times 10^{-4}$) and a lower haemoglobin concentration ($P = 3.4 \times 10^{-5}$) compared to CM patients. Moreover, we detected a reduction of platelet count ($P = 0.0003$) and an increase of leucocyte count ($P = 0.0015$) in CM patients compared to the ones of MM patients, as shown in Figure 1; there was no significant difference between CM and NCM for leucocyte count ($P = 0.14$) and for platelet count ($P = 0.64$). Furthermore, we evidenced a reduction of platelet count in NCM patients compared to the ones of MM patients ($P = 0.018$), whereas there was no difference for the leucocyte count ($P = 0.44$).

Influence of ethnic groups and genetic factors on severe malaria

Table 1 shows the distribution of the ethnic groups according to the clinical phenotypes. Peul and Wolof groups were the most frequent ethnic groups. Peul and Wolof groups differed in their clinical phenotype distribution (Chi-square=6.4, $df=2$, $P=0.04$), whereas there was a trend when comparing Peul to all other ethnic groups (Chi-square=5.6, $df=2$, $P=0.06$). There was a trend in favour of a better protection from CM (OR=0.576, 95% confidence interval 0.296-1.12) and severe malaria (OR= 0.756, 95% confidence interval 0.413-1.387), although not significant ($P > 0.05$). Haemoglobin S and haemoglobin C carriers were rare in CM, NCM, and MM patients, as shown in Table 1. There was no significant association between haemoglobin genotypes and clinical phenotypes.

Table 2 shows the distribution of *NCR3* genotype by clinical status. There were 123 GG, 52 GC, and 8 CC individuals. *NCR3-412* was in Hardy-Weinberg equilibrium ($P=0.35$). *NCR3-412G* allele frequency was 0.84, whereas *NCR3-412C* allele frequency was 0.16. We clustered GC and CC individuals for further analyses.

We tested the association of the *NCR3-412C* allele carriage with severe malaria by using the Chi-square test. To this aim, we compared the distribution of MM patient genotypes with the one of severe malaria

patient genotypes. There was no association with CM (P=0.31), NCM (P=0.13), or severe malaria after grouping CM and NCM patients (P=0.36). In addition, we assessed the power of our analyses on the basis of the sample size used, an α -risk of 5%, and an effect size equal to the one detected by Delahaye et al. for the association of the *NCR3-412C* allele carriage with mild malaria [18]. We obtained a power higher than 85%.

We applied the logistic regression method when taking into account age and gender, which may influence malaria phenotypes. There was no association with CM (P=0.65), NCM (P=0.91), or severe malaria (P=0.66). The odds of CM, NCM, and severe malaria between *NCR3-412GG* and *NCR3-412GG/GC* were 1.139 (95% confidence interval 0.652-1.992), 0.947 (95% confidence interval 0.356-2.519), and 1.128 (95% confidence interval 0.655-1.942), respectively. Similar results were obtained after adding haemoglobin genotypes and ethnic groups as covariates. Besides, we obtained a power of 99.9% based on the sample used, an α -risk of 5%, and an Odd ratio of 2.93 for CM.

Discussion

A few genes have been associated with both mild malaria and severe malaria. We investigated a *NCR3* genetic variant, which was linked and associated with mild malaria in Burkina Faso [18]. We set up a new study population in Senegal, registered biological parameters and ethnic groups, and genotyped DNA samples from patients with either mild or severe malaria for *NCR3-412*, haemoglobin C and haemoglobin S.

Reduced red blood cell count, haematocrit, and haemoglobin concentration were associated with noncerebral malaria, indicating a marked anaemia in those patients compared to mild malaria and cerebral malaria. Thrombocytopenia was associated with both cerebral malaria and severe non-cerebral malaria, as previously reported [24-26]. Thrombocytopenia is thought to be due to platelet sequestration and platelet consumption [27, 28]. In the same way, platelet adhesion to brain endothelial cells has been associated to cerebral malaria [29]. Furthermore, it has been shown to promote adhesion

of infected red blood cells to TNF-stimulated endothelium [30], and to alter gene expression in vitro in human brain microvascular endothelial cells [31], thus contributing to brain endothelial alterations.

Moreover, an increase of leukocyte count was associated with CM, whereas MM patients and NCM patients did not differ in their leukocyte count. In the same way, leukocyte counts were reported to be higher in severe malaria patients compared to the ones in mild malaria patients [32-35], and in malaria patients with high parasitaemia compared to the ones in individuals with low parasitaemia [36, 37]. The increase of leucocyte number is consistent with a strong host inflammatory response associated with severe malaria. Nevertheless, it is likely due to polymorphonuclear leukocyte increase. T, B, and NK lymphocyte counts have been found to be reduced in severe malaria patients [38], whereas the percentage of activated T CD4+, NK, and $\gamma\delta$ T lymphocytes were higher in cerebral malaria patients compared to mild malaria patients [38]. This is consistent with the role of T cell dependent immunopathology in the pathogenesis of cerebral malaria. This also suggests a role of NK and $\gamma\delta$ T lymphocytes in malaria immunopathology. In the same way, NK and $\gamma\delta$ T lymphocytes produce IFN γ and TNF in malaria patients [39-41], while polymorphisms within the natural killer cell complex modulate mouse cerebral malaria [42]. In humans, the effect of NK polymorphisms on severe malaria has been poorly investigated, and yielded conflicting results [43, 44].

Since Peul ethnic group who has a particular genetic background has a lower risk of mild malaria attacks, a lower parasitaemia, and a higher anti-plasmodial antibody response compared to other sympatric ethnic groups [45-47], we hypothesized that Peul ethnic group may also show a better protection from severe malaria. Although we detected a trend in favour of this hypothesis, the association was not significant at the 5% level. This result urged, nevertheless, new studies with a bigger sample size to increase statistical power.

Since, haemoglobin S and haemoglobin C are well known to protect against severe malaria [10, 12, 48], we searched for haemoglobin S and haemoglobin C in our study population. Although we detected both mutations, the frequency of haemoglobin S and haemoglobin C was very low, and we could not provide evidence for a protective effect from severe malaria.

We further assessed the association of *NCR3-412* with severe malaria. Mild malaria patients and severe malaria patients did not differ in their *NCR3-412* allelic frequency. Power studies revealed a power of approximately 85% based on an effect size corresponding to the one found in the mild malaria studies [18]. This indicates that the effect size is significantly lower for severe malaria or that there is no association between the SNP and severe malaria. In the former case, increasing the sample size should allow to detect such association with a small effect size; alternatively, integrating the polymorphisms of other NK cell receptors should increase the power for detecting a putative association of NK receptors with severe malaria. In the later case, the *NCR3* expression may not influence the occurrence of severe malaria. It should be stressed that very few genes have been associated both with mild and severe malaria.

If we assume that there is no association between *NCR3-412* and severe malaria, we should keep in mind that there is an association between *NCR3-412* and mild malaria [18, 19]. It means that there is no allele frequency difference between mild malaria patients and severe malaria patients, on the one hand, and that there is an allele frequency difference between mild malaria patients and individuals with an asymptomatic infection, on the other hand. Also, *NCR3-412* polymorphism may partly explain why individuals with asymptomatic malaria have mild malaria attacks, but unlikely explains why some patients with mild malaria develop severe forms of the disease (Figure 2).

To summarize, we set up a new epidemiological study, which allowed us to confirm the association of cerebral malaria with thrombocytopenia and leukocyte count. Besides, we did not detect an association of severe malaria with *NCR3* genetic variation. This suggests that genetic variation at this locus does not influence the molecular mechanisms involved in the most severe forms of the disease, although it influences the risk of developing mild malaria attacks.

Abbreviations

CI: confidence interval

CM: cerebral malaria

NCM: non-cerebral malaria

MM: mild malaria

NK: natural killer

OR: Odds ratio

Declarations

Acknowledgements

This work was supported by the management of the Institute Pasteur of Dakar, the Directorate of International Affairs of the Institute Pasteur in Paris, the Department of Cultural Action of the French Embassy in Senegal, INSERM, and the university of Aix-Marseille. SB, MS, and SN were supported by a PhD fellowship from the French ministry, PACA regional council, and the Higher Education Commission (HEC) from Pakistan, respectively. We thank all the patients who participated in this study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AT enrolled the patients, performed molecular experiments, and analysed the data. SB was involved in *NCR3* genotyping and data analyses. BM enrolled the patients, and participated in the design of the study. SN, MS, and SM genotyped haemoglobin C and haemoglobin S and managed the data. MT participated in genotyping *NCR3* and *HBB* polymorphisms. MD carried out statistical analyses. MMF was in charge of clinical management of patients, and measurements of clinical and biological parameters, whereas FT processed blood samples. AD and PR conceived the study and supervised the project. PR performed statistical analyses, and wrote the original draft, whereas AT, SB, BB, RND, and AD participated in reviewing and editing the manuscript. All authors read and approved final manuscript and agree to submission.

References

1. WHO: **World Malaria Report 2016**. *Genova: World Health Organization* 2016.
2. Marsh K, Snow RW: **Malaria transmission and morbidity**. *Parassitologia* 1999, **41**:241-246.
3. Greenwood BM: **The epidemiology of malaria**. *Ann Trop Med Parasitol* 1997, **91**:763-769.
4. Hernandez-Valladares M, Rihet P, Iraqi FA: **Host susceptibility to malaria in human and mice: compatible approaches to identify potential resistant genes**. *Physiol Genomics* 2014, **46**:1-16.
5. Marquet S: **Overview of human genetic susceptibility to malaria: From parasitemia control to severe disease**. *Infect Genet Evol* 2017.
6. Brisebarre A, Kumulungui B, Sawadogo S, Atkinson A, Garnier S, Fumoux F, Rihet P: **A genome scan for *Plasmodium falciparum* malaria identifies quantitative trait loci on chromosomes 5q31, 6p21.3, 17p12, and 19p13**. *Malar J* 2014, **13**:198.
7. Milet J, Nuel G, Watier L, Courtin D, Slaoui Y, Senghor P, Migot-Nabias F, Gaye O, Garcia A: **Genome wide linkage study, using a 250K SNP map, of *Plasmodium falciparum* infection and mild malaria attack in a Senegalese population**. *PLoS One* 2010, **5**:e11616.
8. Sakuntabhai A, Ndiaye R, Casademont I, Peerapittayamongkol C, Rogier C, Tortevoeye P, Tall A, Paul R, Turbpaiboon C, Phimpraphi W, et al: **Genetic determination and linkage mapping of *Plasmodium falciparum* malaria related traits in Senegal**. *PLoS One* 2008, **3**:e2000.
9. Band G, Le QS, Jostins L, Pirinen M, Kivinen K, Jallow M, Sisay-Joof F, Bojang K, Pinder M, Sirugo G, et al: **Imputation-based meta-analysis of severe malaria in three African populations**. *PLoS Genet* 2013, **9**:e1003509.
10. Jallow M, Teo YY, Small KS, Rockett KA, Deloukas P, Clark TG, Kivinen K, Bojang KA, Conway DJ, Pinder M, et al: **Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa**. *Nat Genet* 2009, **41**:657-665.

11. Malaria Genomic Epidemiology N, Band G, Rockett KA, Spencer CC, Kwiatkowski DP: **A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection.** *Nature* 2015, **526**:253-257.
12. Timmann C, Thye T, Vens M, Evans J, May J, Ehmen C, Sievertsen J, Muntau B, Ruge G, Loag W, et al: **Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria.** *Nature* 2012, **489**:443-446.
13. Driss A, Hibbert JM, Wilson NO, Iqbal SA, Adamkiewicz TV, Stiles JK: **Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria.** *Malar J* 2011, **10**:271.
14. Kwiatkowski DP: **How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria.** *Am J Hum Genet* 2005, **77**:171-192.
15. Burt RA, Baldwin TM, Marshall VM, Foote SJ: **Temporal expression of an H2-linked locus in host response to mouse malaria.** *Immunogenetics* 1999, **50**:278-285.
16. Hernandez-Valladares M, Naessens J, Gibson JP, Musoke AJ, Nagda S, Rihet P, Ole-MoiYoi OK, Iraqi FA: **Confirmation and dissection of QTL controlling resistance to malaria in mice.** *Mamm Genome* 2004, **15**:390-398.
17. Ohno T, Nishimura M: **Detection of a new cerebral malaria susceptibility locus, using CBA mice.** *Immunogenetics* 2004, **56**:675-678.
18. Delahaye NF, Barbier M, Fumoux F, Rihet P: **Association analyses of NCR3 polymorphisms with *P. falciparum* mild malaria.** *Microbes Infect* 2007, **9**:160-166.
19. Baaklini S, Afridi S, Nguyen TN, Koukouikila-Koussounda F, Ndounga M, Imbert J, Torres M, Pradel L, Ntoumi F, Rihet P: **Beyond genome-wide scan: Association of a cis-regulatory NCR3 variant with mild malaria in a population living in the Republic of Congo.** *PLoS One* 2017, **12**:e0187818.
20. Mavoungou E, Held J, Mewono L, Kremsner PG: **A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes by natural killer cells.** *J Infect Dis* 2007, **195**:1521-1531.

21. Saissy JM, Rouvin B, Koulmann P: **[Severe malaria in intensive care units in 2003]**. *Med Trop (Mars)* 2003, **63**:258-266.
22. Koukouikila-Koussounda F, Ntoumi F, Ndounga M, Tong HV, Abena AA, Velavan TP: **Genetic evidence of regulatory gene variants of the STAT6, IL10R and FOXP3 locus as a susceptibility factor in uncomplicated malaria and parasitaemia in Congolese children**. *Malar J* 2013, **12**:9.
23. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN: **Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies**. *Am J Epidemiol* 2009, **169**:505-514.
24. Gerardin P, Rogier C, Ka AS, Jouvencel P, Brousse V, Imbert P: **Prognostic value of thrombocytopenia in African children with *falciparum* malaria**. *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**:686-691.
25. Lampah DA, Yeo TW, Malloy M, Kenangalem E, Douglas NM, Ronaldo D, Sugiarto P, Simpson JA, Poespoprodjo JR, Anstey NM, Price RN: **Severe malarial thrombocytopenia: a risk factor for mortality in Papua, Indonesia**. *J Infect Dis* 2015, **211**:623-634.
26. Muwonge H, Kikomeko S, Sembajjwe LF, Seguya A, Namugwanya C: **How Reliable Are Hematological Parameters in Predicting Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in an Endemic Region?** *ISRN Trop Med* 2013, **2013**:1-9.
27. Akinosoglou KS, Solomou EE, Gogos CA: **Malaria: a haematological disease**. *Hematology* 2012, **17**:106-114.
28. Karanikas G, Zedwitz-Liebenstein K, Eidherr H, Schuetz M, Sauerman R, Dudczak R, Winkler S, Pabinger I, Kletter K: **Platelet kinetics and scintigraphic imaging in thrombocytopenic malaria patients**. *Thromb Haemost* 2004, **91**:553-557.
29. Grau GE, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, Cataldo C, Taylor TE, Molyneux ME: **Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria**. *J Infect Dis* 2003, **187**:461-466.

30. 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, **189**:180-189.
31. Barbier M, Faille D, Loriod B, Textoris J, Camus C, Puthier D, Flori L, Wassmer SC, Victorero G, Alessi MC, et al: **Platelets alter gene expression profile in human brain endothelial cells in an *in vitro* model of cerebral malaria.** *PLoS One* 2011, **6**:e19651.
32. Berens-Riha N, Kroidl I, Schunk M, Alberer M, Beissner M, Pritsch M, Kroidl A, Froschl G, Hanus I, Bretzel G, et al: **Evidence for significant influence of host immunity on changes in differential blood count during malaria.** *Malar J* 2014, **13**:155.
33. Cserti-Gazdewich CM, Dhabangi A, Musoke C, Ssewanyana I, Ddungu H, Nakiboneka-Ssenabulya D, Nabukeera-Barungi N, Mpimbaza A, Dzik WH: **Inter-relationships of cardinal features and outcomes of symptomatic pediatric *Plasmodium falciparum* MALARIA in 1,933 children in Kampala, Uganda.** *Am J Trop Med Hyg* 2013, **88**:747-756.
34. Modiano D, Sirima BS, Konate A, Sanou I, Sawadogo A: **Leucocytosis in severe malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, **95**:175-176.
35. van Wolfswinkel ME, Vliegenthart-Jongbloed K, de Mendonca Melo M, Wever PC, McCall MB, Koelewijn R, van Hellemond JJ, van Genderen PJ: **Predictive value of lymphocytopenia and the neutrophil-lymphocyte count ratio for severe imported malaria.** *Malar J* 2013, **12**:101.
36. Kotepui M, Piwkhram D, PhunPhuech B, Phiwklam N, Chupeerach C, Duangmano S: **Effects of malaria parasite density on blood cell parameters.** *PLoS One* 2015, **10**:e0121057.
37. McKenzie FE, Prudhomme WA, Magill AJ, Forney JR, Permpanich B, Lucas C, Gasser RA, Jr., Wongsrichanalai C: **White blood cell counts and malaria.** *J Infect Dis* 2005, **192**:323-330.
38. Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Gilchrist JJ, Graham SM, Pensulo P, Mwimaniwa G, Banda M, Taylor TE, Molyneux EE, et al: **Lymphocyte Perturbations in Malawian Children with Severe and Uncomplicated Malaria.** *Clin Vaccine Immunol* 2015, **23**:95-103.

39. D'Ombrain MC, Hansen DS, Simpson KM, Schofield L: **gammadelta-T cells expressing NK receptors predominate over NK cells and conventional T cells in the innate IFN-gamma response to *Plasmodium falciparum* malaria.** *Eur J Immunol* 2007, **37**:1864-1873.
40. Horowitz A, Newman KC, Evans JH, Korbel DS, Davis DM, Riley EM: **Cross-talk between T cells and NK cells generates rapid effector responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes.** *J Immunol* 2010, **184**:6043-6052.
41. Stanisic DI, Cutts J, Eriksson E, Fowkes FJ, Rosanas-Urgell A, Siba P, Laman M, Davis TM, Manning L, Mueller I, Schofield L: **gammadelta T cells and CD14+ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria.** *J Infect Dis* 2014, **210**:295-305.
42. Hansen DS, Ryg-Cornejo V, Ioannidis LJ, Chiu CY, Ly A, Nie CQ, Scalzo AA, Schofield L: **The contribution of natural killer complex loci to the development of experimental cerebral malaria.** *PLoS One* 2014, **9**:e93268.
43. Olaniyan SA, Amodu OK, Yindom LM, Conway DJ, Aka P, Bakare AA, Omotade OO: **Killer-cell immunoglobulin-like receptors and *falciparum* malaria in southwest Nigeria.** *Hum Immunol* 2014, **75**:816-821.
44. Yindom LM, Forbes R, Aka P, Janha O, Jeffries D, Jallow M, Conway DJ, Walther M: **Killer-cell immunoglobulin-like receptors and malaria caused by *Plasmodium falciparum* in The Gambia.** *Tissue Antigens* 2012, **79**:104-113.
45. Arama C, Maiga B, Dolo A, Kouriba B, Traore B, Crompton PD, Pierce SK, Troye-Blomberg M, Miller LH, Doumbo OK: **Ethnic differences in susceptibility to malaria: what have we learned from immuno-epidemiological studies in West Africa?** *Acta Trop* 2015, **146**:152-156.
46. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Lanfrancotti A, Petrarca V, Cruciani F, Simpore J, Ciminelli BM, Foglietta E, Grisanti P, et al: **The lower susceptibility to *Plasmodium falciparum***

malaria of Fulani of Burkina Faso (west Africa) is associated with low frequencies of classic malaria-resistance genes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001, **95**:149-152.

47. Modiano D, Petrarca V, Sirima BS, Nebie I, Diallo D, Esposito F, Coluzzi M: **Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in west African sympatric ethnic groups.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:13206-13211.
48. Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Simpore J, Verra F, Konate A, Rastrelli E, Olivieri A, Calissano C, Paganotti GM, et al: **Haemoglobin C protects against clinical *Plasmodium falciparum* malaria.** *Nature* 2001, **414**:305-308.

Figure legends

Figure 1. Haematological characteristics of mild malaria (MM), cerebral malaria (CM), and non-cerebral malaria (NCM) patients. (A) Platelet count (x10³/μL). (B) Leucocyte count (x10³/μL). Median, 25th and 75th percentile are shown for each group. Significant differences between MM and CM, and between MM and NCM are shown. P values have been calculated by using Mann-Whitney test (*** P<0.001; ** P<0.01; * P<0.05).

Figure 2. *NCR3* and severity of the disease. *NCR3-412C* allele that increased the risk of mild malaria was shown to decrease both the binding of transcription factors to the promoter and *NCR3* expression. Here we report that there was no difference between *NCR3-412* allele frequency between mild malaria patients and severe malaria patients. Therefore, *NCR3-412* polymorphism unlikely explains why some patients with mild malaria develop severe forms of the disease.

Table 1: Characteristics of patients

	Cerebral malaria (N = 85)	Non cerebral malaria (N = 27)	Mild malaria (N = 76)
Gender			
Female	28	10	34
Male	57	17	42
Survival			
Dead	19	1	0
Alive	66	26	76
Ethnic group^a			
Bambara	8	3	5
Diola	5	3	2
Peulh	22	14	30
Serrere	8	0	9
Soninke	3	1	8
Wolof	28	4	20
Others	11	2	2
Age^b			
Median (25 th and 75 th percentile)	22 (12-41)	8 (3-33)	27 (13-41)
Haematological data^b			
- Red blood cells ($\times 10^6/\mu\text{L}$)			
Median (25 th and 75 th percentile)	3.8 (3.0-4.3)	2.8 (2.4-4.1)	4.0 (3.5-4.6)
- Haematocrit (%)			
Median (25 th and 75 th percentile)	30.6 (25.8-34.4)	20.0 (16.9 -27.5)	35.0 (29.7 – 38.7)
- Haemoglobin (g/dL)			
Median (25 th and 75 th percentile)	10.4 (8.4-11.9)	7.1 (5.3-9.4)	11.1 (9.8-12.5)
- Leucocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			
Median (25 th and 75 th percentile)	11.0 (6.5-14.0)	7.9 (5.4-12.9)	7.9 (5.0-10.6)
- Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)			
Median (25 th and 75 th percentile)	87.5 (40.0-168.3)	100.5 (58.5-165.0)	183.0 (83.0-237.8)
HBB genetic variation^c			
- Hb S carrier, n (%)	3 (3.6)	1 (3.7)	5 (6.7)
- Hb C carrier, n (%)	0 (0.0)	2 (7.4)	1 (1.3)

^aEthnic groups are shown. Other ethnic groups that are Bassari, Cap-vert, Mandinge, and Soce groups were rare ($n \leq 5$). The ethnic group was unknown for two individuals.

^bMedian and (25th and 75th percentile) are shown

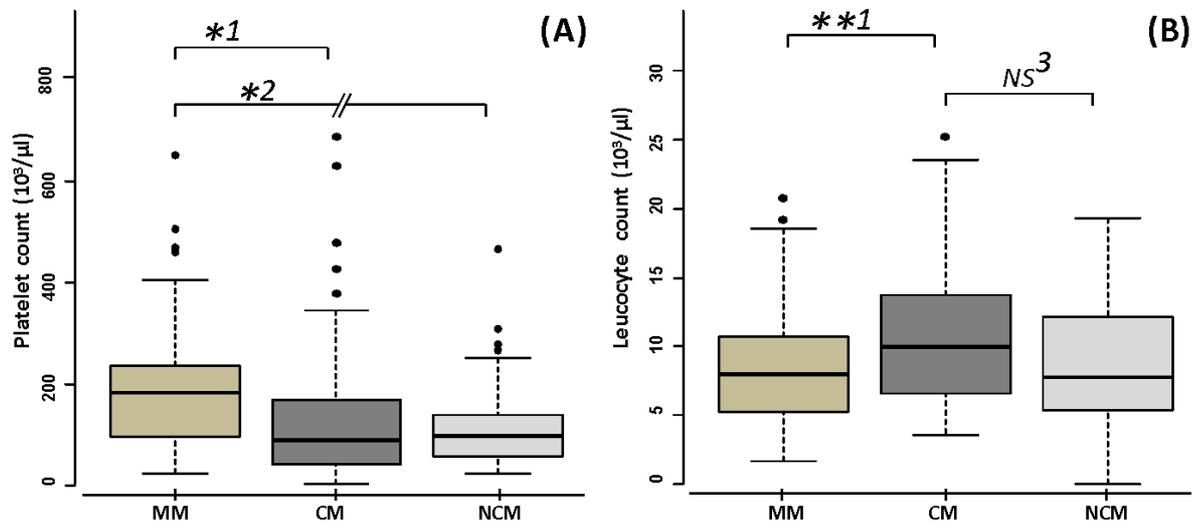
^cTwo individuals have not been genotyped

Table 2: Clinical status of patients for *NCR3-412* polymorphism

Genotype	Cerebral malaria	Non cerebral malaria	Mild malaria	Total
CC	5	0	3	8
GC	19	9	24	52
GG	58	18	47	123
Total	82 ^a	27	74 ^a	183

^aThree CM and 2 MM individuals have not been genotyped

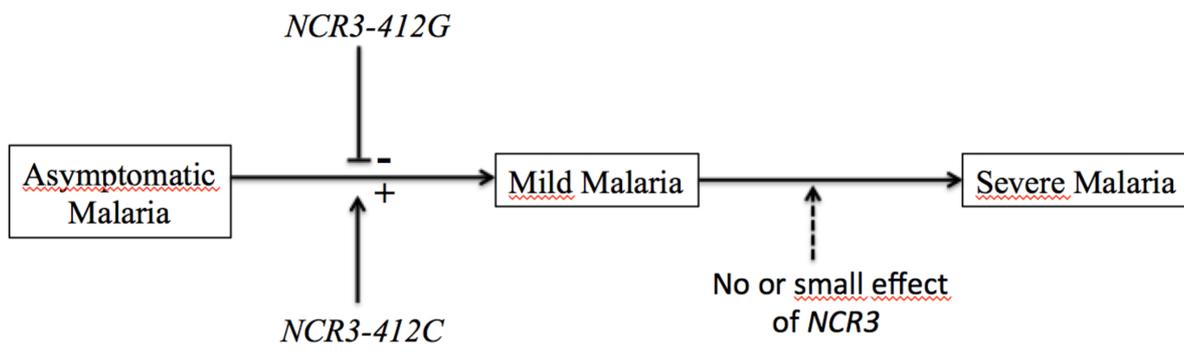
Figure 1



(1) = Comparison between MM & CM; (2) = Comparison between MM & NCM; (3) = Comparison between CM & NCM

(*) = Comparison between MM & CM; (**) = Comparison between MM & NCM; (***) = Comparison between CM & NCM

Figure 2



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. ANALYSE D'ASSOCIATION ET CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE VARIANTS DU TNF AVEC LA PARASITÉMIE MAXIMALE SYMPTOMATIQUE ET LES ACCÈS PALUSTRES SIMPLES DANS UNE POPULATION DU CONGO

Plusieurs études de liaison région-candidate et pangénomique dans différentes populations africaines ont mis en évidence une liaison significative du locus 6p21-p23 avec les accès palustres simples ([Brisebarre et al., 2014](#); [Laurence Flori et al., 2003](#); [A. Jepson et al., 1997](#)) ainsi qu'avec la parasitémie maximale ([Laurence Flori et al., 2003](#)), suggérant un rôle majeur des gènes présents dans ce locus dans le contrôle de la résistance aux formes simples de la maladie.

Parmi les différents gènes situés sous ce pic de liaison, on retrouve le *TNF- α* , dont le double rôle dans la défense de l'hôte et dans la pathogenèse du paludisme simple et compliqué a suscité un grand intérêt pour les études génétiques.

La majorité des analyses d'association génétique portant sur ce gène ont démontré des associations entre des polymorphismes situés au niveau de son promoteur (*TNF-238*, *TNF-308* et *TNF-376*) et les formes sévères du paludisme ([Aidoo et al., 2001](#); [Clark et al., 2009](#); [Gichohi-Wainaina et al., 2015](#); [J. C. Knight et al., 1999](#); [McGuire et al., 1994](#); [Wattavidanage et al., 1999](#)), corroborant ainsi les observations cliniques qui témoignent du rôle du *TNF- α* dans l'infection palustre sévère. Quelques études ont aussi montré qu'il existe une association entre des polymorphismes du promoteur du *TNF* avec les formes non compliquées tels que la parasitémie maximale (*TNF1304* et *TNF-238*) et les accès fébriles (*TNF1304* et *TNF-308*) ([L. Flori et al., 2005](#)).

La République démocratique du Congo a enregistré dix-neuf millions de cas de paludisme dont quarante-deux mille décès en 2015 ([WHO, 2016a](#)). Peu de données génétiques en lien avec les maladies infectieuses sont disponibles dans la population congolaise ([Koukouikila-Koussounda & Ntoumi, 2016](#)) et aucune étude à ce jour n'a été menée pour étudier le rôle du *TNF* dans l'infection palustre dans cette population. Nous nous sommes donc intéressés à l'association des variants précédemment trouvés dans la population burkinabé

(*TNF-308*, *TNF-244*, *TNF-238* et *TNF1304*) avec les phénotypes de parasitémie maximale et d'accès palustre simple dans la population du Congo.

1. LES POLYMORPHISMES DU *TNF* SONT-ILS RETROUVÉS ASSOCIÉS DANS LA POPULATION DU CONGO ?

Parmi les 4 polymorphismes analysés, nous avons trouvé une association nominale entre les variants *TNF-308*, *TNF-244*, *TNF-238* et la parasitémie maximale symptomatique et entre le *TNF-244* et le nombre d'accès palustres. Mais après correction des tests multiples seul le *TNF-244* reste associé à la parasitémie. À notre connaissance, c'est la première fois que ce polymorphisme est retrouvé associé à un phénotype palustre.

L'association entre le *TNF1304* et ces phénotypes, qui a été décrite une fois dans l'étude du Burkina Faso (L. Flori et al., 2005), n'a pas été retrouvée dans la population congolaise. Néanmoins, dans l'étude burkinabé, le *TNF1304* n'était plus associé à la parasitémie lorsque l'effet du *TNF-238* était pris en compte, ce qui suggère que le *TNF1304* ne serait pas un variant causal mais que son association avec la parasitémie était due à un déséquilibre de liaison avec le *TNF-238* ou le variant causal non identifié. Enfin, lorsque nous avons examiné son effet potentiel en tant que SNP cis-régulateur, nous n'avons trouvé aucun facteur de la transcription candidat dont la liaison serait altérée par l'un ou l'autre des allèles de ce polymorphisme.

Bien qu'après correction des tests multiples, il ne subsiste plus d'association significative du *TNF-308*, on observe tout de même une tendance à l'association du variant *TNF-308A* et la sensibilité à une parasitémie maximale élevée, corroborant la même tendance décrite dans de nombreuses autres études. En effet, les enfants gambiens homozygotes pour l'allèle *TNF-308A* sont plus vulnérables au paludisme cérébral (McGuire et al., 1994) et une tendance similaire a été observée chez les enfants kényans (J. C. Knight et al., 1999). Chez les enfants gabonais présentant cet allèle, on observe un intervalle significativement plus court de réinfection à *P. falciparum* (Meyer et al., 2002). De plus, le même allèle a été associé à diverses autres maladies infectieuses, y compris la leishmaniose, la lèpre lépromateuse, le trachome et la septicémie à

méningocoques (Julian C. Knight & Kwiatkowski, 1999) ; et une étude menée au Sri Lanka a révélé que les porteurs de cet allèle présentaient un risque accru de maladies infectieuses graves en général (Wattavidanage et al., 1999). Néanmoins, au Burkina Faso et en Tanzanie, l'allèle *TNF-308A* a été associé à la résistance aux accès palustres simples et au nombre d'épisodes fébriles (L. Flori et al., 2005; Gichohi-Wainaina et al., 2015), et une étude conduite en Tanzanie n'a pas retrouvé d'association avec ce polymorphisme (Stirnadel et al., 1999).

De la même manière, l'effet fonctionnel du *TNF-308* est controversé. En effet, certaines études n'ont pas réussi à démontrer un effet de ce polymorphisme sur la production du TNF- α (Brinkman, Zuijdeest, Kaijzel, Breedveld, & Verweij, 1995; Kaijzel et al., 2001) alors que plusieurs ont décrit une corrélation entre le *TNF-308A* et une expression accrue du TNF- α (Karimi, Goldie, Cruickshank, Moses, & Abraham, 2009; Kroeger, Carville, & Abraham, 1997; Wilson, Symons, McDowell, McDevitt, & Duff, 1997). Ces différences peuvent s'expliquer par des variations dans la conception de l'étude, plus précisément les différents modèles cellulaires utilisés, la présence et la nature d'une stimulation des cellules ou encore le fragment d'ADN présentant l'allèle (taille, recoupement avec les empreintes DNaseI, de méthylation d'histone...) (Julian C. Knight, 2005) ; mais aussi par une coopération potentielle entre plusieurs variants dans la région, comme l'a suggéré l'étude de Knight *et al.* (Julian C. Knight, Keating, Rockett, & Kwiatkowski, 2003) dans laquelle ils ont montré, au moyen d'une expérience d'haploChIP, l'effet substantiel d'un haplotype contenant le *TNF-308A* sur l'expression de *LTA*.

Globalement, ces résultats divergents sous-tendent deux explications possibles. La première est que le *TNF-308* n'est peut-être pas le SNP causal mais qu'il est en déséquilibre de liaison avec la mutation causale. Alternativement, le variant *TNF-308* peut avoir un effet modéré ou agir en épistasie avec d'autres polymorphismes.

Les mêmes observations sont faites concernant le variant *TNF-238*. Dans notre étude, on détecte une tendance à l'association entre le *TNF-238A* et la susceptibilité à une parasitémie maximale accrue, corroborant les associations retrouvées avec l'anémie sévère en Gambie et avec le paludisme cérébral au Kenya (J. C. Knight et al., 1999; McGuire et al., 1999). Cependant, cet allèle n'a

été associée ni à une anémie sévère au Kenya et au Malawi, ni au paludisme cérébral en Gambie (Clark et al., 2009; J. C. Knight et al., 1999). De plus, dans la population burkinabé, cet allèle était associé à une parasitémie maximale réduite (L. Flori et al., 2005). Tout comme pour le *TNF-308*, ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par l'effet d'autres SNP sur les phénotypes du paludisme ou sur la production de TNF- α (Clark et al., 2009). Le *TNF-238* pourrait n'avoir aucun effet moléculaire et être en déséquilibre de liaison avec un SNP causal.

2. QUEL RÔLE FONCTIONNEL POUR LES VARIANTS *TNF-244* ET *TNF-238* ?

Nos analyses bioinformatiques et expérimentales corroborent l'hypothèse selon laquelle le *TNF-238* a un effet régulateur, tout comme le *TNF-244* qui n'avait pas été examiné avant notre étude. En effet, l'analyse bio-informatique montre que le *TNF-238* et le *TNF-244* sont co-localisés au niveau du site de mêmes facteurs de transcription, ce qui suggère un potentiel effet combiné de ces polymorphismes. Les variants *TNF-238A* et *TNF-244A* diminuent l'activité du promoteur dans la lignée cellulaire THP1. Les expériences de gel retard et de gène rapporteur montrent une altération de la fixation de protéines nucléaires en présence du variant *TNF-238A* ou du variant *TNF-244A* entraînant une diminution de l'expression du gène ; mais aussi la création d'un site de fixation pour la combinaison *TNF-244G/TNF-238A* ; ce qui pourrait expliquer les différences observées dans les différentes études fonctionnelles et génétiques.

Des analyses *in silico* complémentaires nous ont permis d'identifier des facteurs candidats présentant des « altérations » similaires à celle obtenues dans les expériences de gel retard, à savoir STAT3 et ANT qui semblent correspondre aux complexes se fixant préférentiellement sur la séquence présentant la combinaison *TNF-244G/TNF-238G* (de meilleures p-valeurs étant obtenues pour cette combinaison) et les facteurs GFI1 et LFA1 qui semblent correspondre au complexe se fixant exclusivement à la combinaison *TNF-244G/TNF-238A*. Ces derniers résultats renforcent l'hypothèse d'une action synergique des 2 variants *TNF-244* et *TNF-238* (Fig. 27). Néanmoins des expériences complémentaires sont nécessaires, d'une part pour confirmer l'association du *TNF-244* dans une

population indépendante et d'autre part pour confirmer l'identité des facteurs candidats et l'effet synergique de ces 2 polymorphismes.

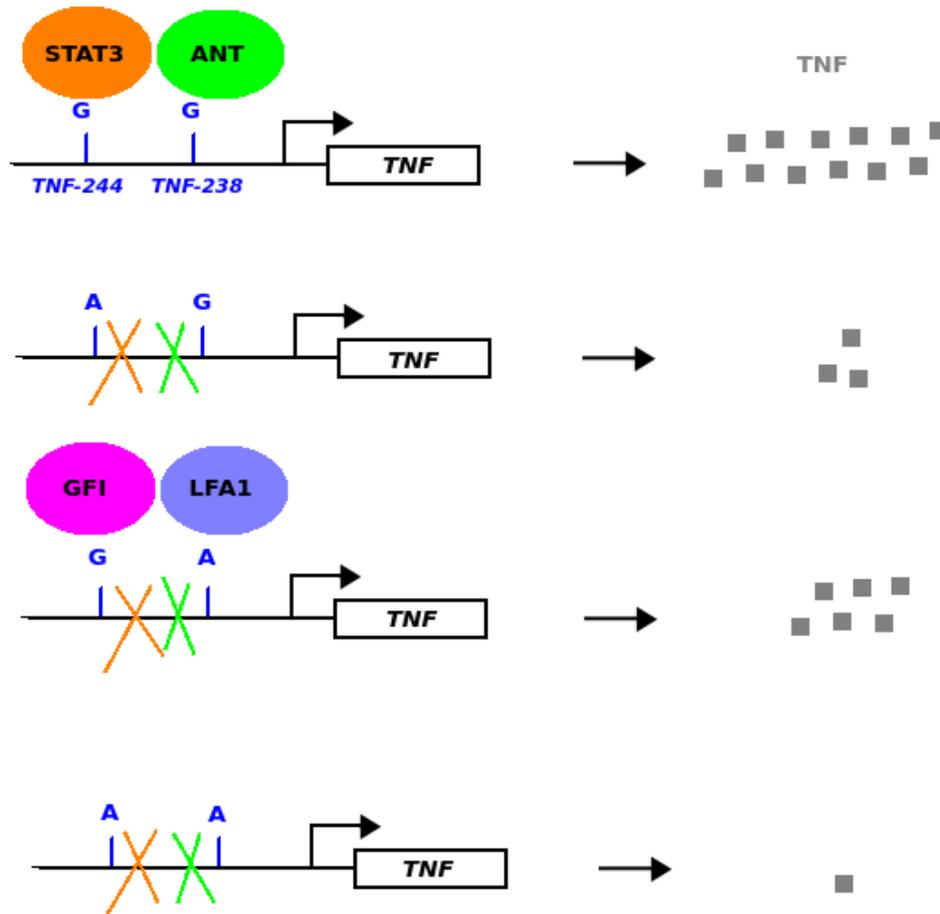


Fig. 27. Modèle biologique illustrant la fonction cis-régulatrice synergique des variants *TNF-244/TNF-238*. En présence de la combinaison *TNF-244G/TNF-238G*, les facteurs STAT3 et ANT se fixent au niveau du promoteur, et la production du TNF est optimale. La mutation de l'un ou l'autre des variants entraîne une perte du site reconnu par ces deux facteurs; ce qui devrait engendrer une diminution de la production de TNF pour toutes les autres combinaisons. Or la mutation unique du *TNF-238A*, et donc la combinaison *TNF-244G/TNF-238A* crée un site de fixation pour les facteurs GFI1 et LFA1, qui compense la perte du site de STAT3 et ANT, permettant une production de TNF non altérée. Ceci explique aussi pourquoi, seul le *TNF-244A* reste significativement associé à une parasitémie symptomatique maximale élevée.

B. CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE ET ANALYSE D'ASSOCIATION D'UN VARIANT DU NCR3 AVEC LES ACCÈS PALUSTRES SIMPLES ET SÉVÈRES

NCR3-412 a été retrouvé associé à un phénotype d'accès palustre simple pour la première fois dans une étude conduite au Burkina-Faso ([Delahaye et al., 2007](#)). L'intérêt s'était porté sur ce gène non seulement pour sa localisation sous le pic de liaison pangénomique avec les formes palustres simples mais aussi en raison de sa fonction biologique.

En effet, le récepteur NKp30 (codé par ce gène) est impliqué dans la reconnaissance de différents types cellulaires pathogéniques, telles que les cellules tumorales ([Pende et al., 1999](#)), les cellules infectées par les virus ([Golden-Mason, Cox, Randall, Cheng, & Rosen, 2010](#)) ou les cellules fongiques (S. S. Li et al., 2013) à l'origine de l'activation des NK et l'élimination de ces cellules. Par ailleurs, des études ont montré que les cellules NK interagissent directement avec les érythrocytes infectés par *Plasmodium* ([Artavanis-Tsakonas et al., 2003](#); [Baratin et al., 2007](#); [Korbel et al., 2005](#)). Différents mécanismes d'action de ces Natural Killer contre les érythrocytes infectés ont été proposés. L'interaction NK/globule rouge infecté pourrait conduire à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IFN- γ ([Artavanis-Tsakonas et al., 2003](#)), mais pourrait conduire aussi à une réponse cytotoxique ([Bouyou-Akotet et al., 2004](#); [Qingfeng Chen et al., 2014](#); [Mavoungou et al., 2007, 2003](#); [Orago & Facer, 1991](#)).

Une étude récente a mis en évidence in vitro qu'une reconnaissance des antigènes parasitaires à la surface des érythrocytes infectés par les récepteurs NKp30 active la cytotoxicité des cellules NK par l'intermédiaire d'une libération de granzymes B et de perforines ([Mavoungou et al., 2007, 2003](#)). Cette étude a identifié un ligand reconnu par le récepteur NKp30 : DBL1 α , un domaine de l'antigène plasmodial PfEMP1 ancré à la surface du globule rouge. Par ailleurs, différentes études avaient déjà montré qu'une sous-expression de ces récepteurs à la surface des NK engendre une diminution de la capacité cytotoxique des cellules NK. ([Costello et al., 2002](#); [Pende et al., 1999](#)).

Ainsi au vu de l'association du variant *NCR3-412C* à la susceptibilité aux accès palustres simples au Burkina Faso, de l'implication des cellules NK dans la

réponse immunitaire dirigée contre les globules rouges parasités, et de la controverse quant au type de réponse (cytokinique ou cytotoxique) des NK et de l'implication de NKp30 dans l'infection palustre, nous avons émis différentes hypothèses biologiques quant au rôle fonctionnel du polymorphisme *NCR3-412* (Fig. 28, Fig. 29).

Dans l'ensemble, ces hypothèses suggèrent qu'un polymorphisme qui altérerait l'expression du récepteur NKp30 aurait un impact sur le risque de développer un accès palustre simple de part une modification de la réponse immunitaire des NK dirigée contre les érythrocytes infectés.

L'objectif de ma thèse a donc été de caractériser plus précisément l'effet cis-régulateur du variant *NCR3-412*, préciser quel modèle biologique correspond le mieux aux évidences fonctionnelles et confirmer son association avec le phénotype paludisme simple dans une population indépendante du Congo.

MODÈLES DE RÉPONSE CYTOTOXIQUE

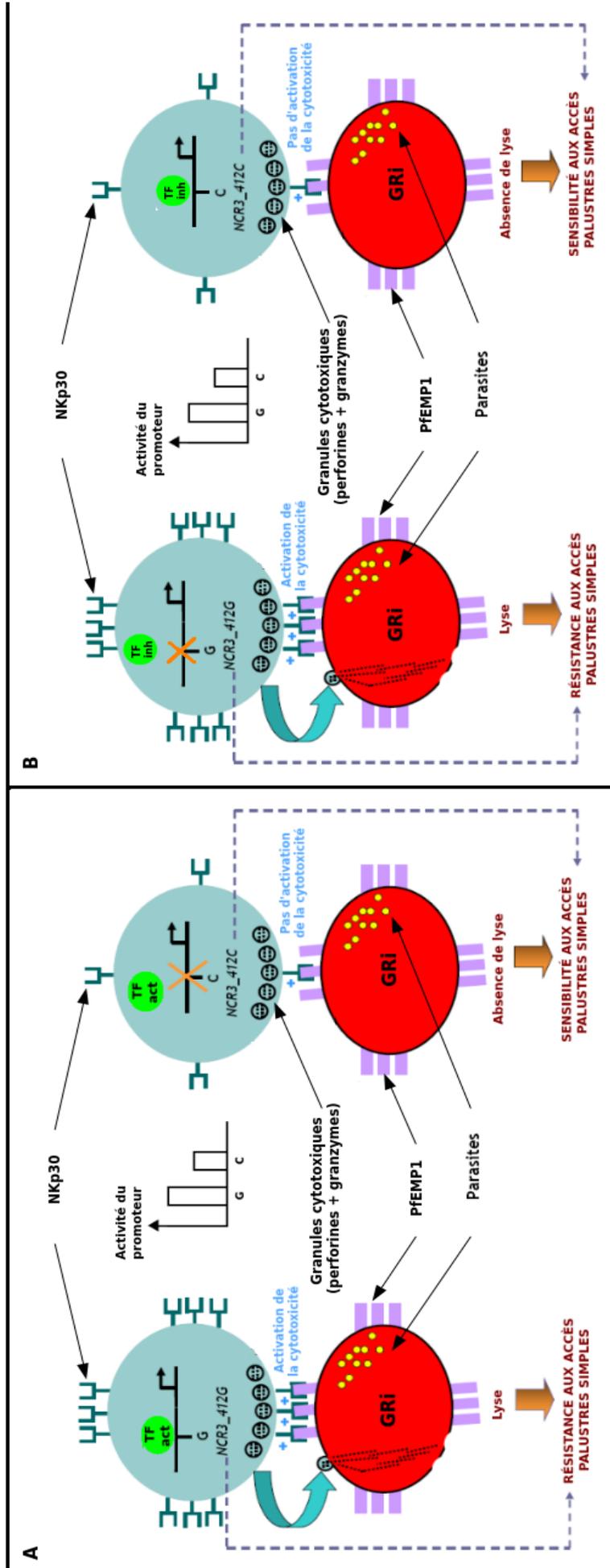


Fig. 28. Hypothèses fonctionnelles de réponses cytotoxiques. A. Le promoteur présentant NCR3-412 est un site d'activation. En présence de l'allèle G, les facteurs de la transcription se fixent et activent l'expression du gène NCR3. L'activité promotrice en présence du variant G est élevée. L'expression de NKp30 à la surface des NK est optimale et permet une activation efficace de la cytotoxicité après reconnaissance de PfEMP1. Les globules rouges parasités sont lysés et ne provoquent pas d'accès palustre. Ainsi le porteur de l'allèle G est moins susceptible de développer un accès palustre. En présence de l'allèle C, les facteurs de la transcription ne se fixent pas au niveau du promoteur et n'activent pas l'expression du gène NCR3. L'activité promotrice en présence du variant C est réduite. La sous-expression de NKp30 à la surface des NK ne permet pas une activation de la cytotoxicité malgré la reconnaissance de PfEMP1. Les globules rouges parasités ne sont pas lysés et provoquent un accès palustre. Ainsi le porteur de l'allèle C est plus susceptible de développer un accès palustre. B. Le promoteur présentant NCR3-412 est un site de répression. En présence de l'allèle C, un complexe protéique inhibiteur se fixe et inhibe l'expression du gène NCR3. L'activité promotrice en présence du variant C est réduite. La sous-expression de NKp30 à la surface des NK ne permet pas une activation de la cytotoxicité malgré la reconnaissance de PfEMP1. Les globules rouges parasités ne sont pas lysés et provoquent un accès palustre. Ainsi le porteur de l'allèle C est plus susceptible de développer un accès palustre. En présence de l'allèle G, ce complexe protéique inhibiteur ne se fixe pas sur la région promotrice et l'expression du gène NCR3 est élevée. L'activité promotrice en présence du variant G est augmentée. L'expression de NKp30 à la surface des NK est optimale et permet une activation efficace de la cytotoxicité après reconnaissance de PfEMP1. Les globules rouges parasités sont lysés et ne provoquent pas d'accès palustre. Ainsi le porteur de l'allèle G est moins susceptible de développer un accès palustre.

MODÈLES DE RÉPONSE CYTOKINIQUE

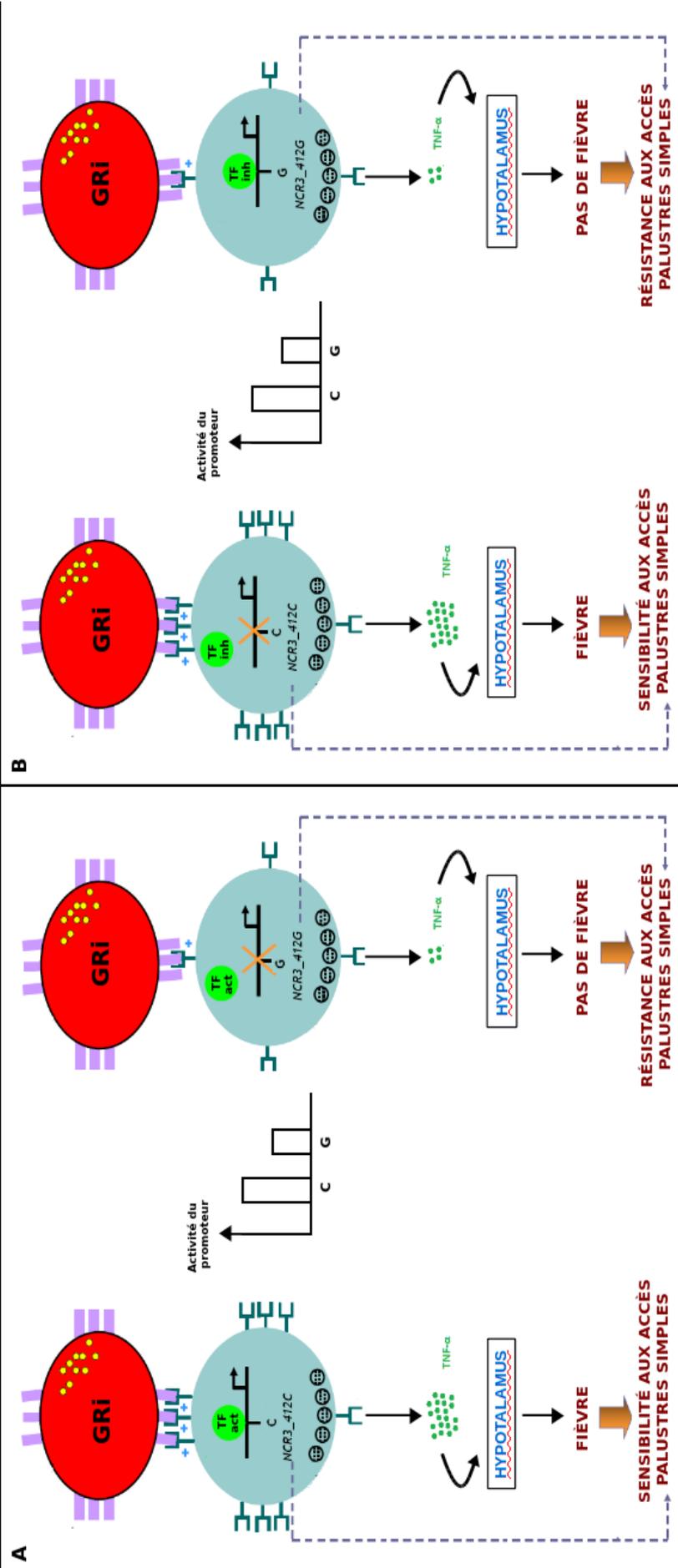


Fig. 29. Hypothèses fonctionnelles de réponses cytokiniques. A. Le promoteur présentant NCR3-412 est un site d'activation. En présence de l'allèle C, les facteurs de la transcription se fixent et activent l'expression du gène NCR3. L'activité promotrice en présence du variant C est élevée. L'expression de NKp30 à la surface des NK est optimale et permet une production de TNF importante suite à reconnaissance de PfEMP1. La quantité de TNF produite est importante et exerce une activité pyrogénique au niveau de l'hypothalamus à l'origine d'un accès palustre. Ainsi le porteur de l'allèle C est plus susceptible de développer un accès palustre. En présence de l'allèle G, les facteurs de la transcription ne se fixent pas au niveau du promoteur et n'activent pas l'expression du gène NCR3. L'activité promotrice en présence du variant G est réduite. La sous-expression de NKp30 à la surface des NK ne permet pas une activation de la production de TNF malgré la reconnaissance de PfEMP1. La quantité de TNF produite n'est pas suffisante pour exercer une activité pyrogénique au niveau de l'hypothalamus et un accès palustre est évité. Ainsi le porteur de l'allèle G est moins susceptible de développer un accès palustre. B. Le promoteur présentant NCR3-412 est un site de répression. En présence de l'allèle G, un complexe protéique inhibiteur se fixe et inhibe l'expression du gène NCR3. L'activité promotrice en présence du variant G est réduite. La sous-expression de NKp30 à la surface des NK ne permet pas une activation de la production de TNF malgré la reconnaissance de PfEMP1. La quantité de TNF produite n'est pas suffisante pour exercer une activité pyrogénique au niveau de l'hypothalamus et un accès palustre est évité. Ainsi le porteur de l'allèle G est moins susceptible de développer un accès palustre. En présence de l'allèle C, ce complexe protéique inhibiteur ne se fixe pas sur la région promotrice et l'inhibition de l'expression du gène NCR3 est levée. L'activité promotrice en présence du variant C est augmentée. L'expression de NKp30 à la surface des NK est optimale et permet une production de TNF importante suite à reconnaissance de PfEMP1. La quantité de TNF produite est importante et exerce une activité pyrogénique au niveau de l'hypothalamus à l'origine d'un accès palustre. Ainsi le porteur de l'allèle C est plus susceptible de développer un accès palustre.

1. LE VARIANT *NCR3-412* EST-IL FONCTIONNEL ET QUELLE EST SA RELATION AVEC LE PHÉNOTYPE DE RÉSISTANCE ?

La première question à laquelle nous nous sommes intéressés, est de savoir si des protéines nucléaires se fixent au niveau de la séquence présentant le polymorphisme *NCR3-412*. Pour cela nous avons conduit des expériences de gel retard qui ont montré que deux complexes protéiques se fixent préférentiellement au niveau de la séquence portant le variant *NCR3-412G*. Nous nous sommes ensuite demandé si le variant influence l'activité promotrice du gène. Nous avons donc effectué des expériences de gène-rapporteur dans des cellules K-562 qui expriment l'ARNm du gène *NCR3* (Srivastava & Srivastava, 2006). Notre choix c'est porté sur ce type cellulaire en raison de limitation technique dans la transfection des NK92. Ces expériences ont montré que le variant *NCR3-412G* est associé à une activité promotrice significativement plus élevée que le variant *NCR3-412C*. Autrement dit, les cellules NK des individus porteurs de l'allèle *NCR3-412G* expriment plus de récepteurs NKp30 que les individus porteurs de l'allèle *NCR3-412C*. Au vu de l'association de l'allèle *NCR3-412C* à la susceptibilité au accès palustre simple dans la population burkinabé, ces premiers résultats nous ont précisé qu'un modèle de réponse cytotoxique était à privilégier. Dans ce modèle, les porteurs du variant *NCR3-412C*, présentent une altération de la fixation de facteur de transcription au niveau du promoteur ; ceci résulte en une sous-expression du récepteur NKp30 à la surface des cellules NK et une incapacité à activer la cytotoxicité de ces cellules. Par ailleurs, la corrélation d'une diminution de cytotoxicité avec une diminution d'expression de NKp30 a déjà été décrite in vitro par Pende *et al.* et ex vivo par Costello *et al.* chez des patients atteints de leucémie aiguë, ce qui conforte notre hypothèse dans le cas de l'infection à *Plasmodium* (Costello *et al.*, 2002; Pende *et al.*, 1999).

Nous avons ensuite cherché à déterminer par des approches bio-informatiques quels facteurs de la transcription sont affectés par la présence de l'un ou l'autre des variants du *NCR3-412*. Celles-ci ont permis d'identifier les facteurs STAT4 et RUNX3. L'identification de STAT4 comme facteur de la transcription impacté par *NCR3-412* est intéressant dans le sens où son activation par l'IL-12 en combinaison avec l'IL-2 a déjà été montré comme impliqué dans

l'activation de la cytotoxicité, la production d'IFN- γ et la prolifération dans les cellules NK au repos (Thierfelder et al., 1996; K. S. Wang, Frank, & Ritz, 2000; K. S. Wang, Ritz, & Frank, 1999). Par ailleurs, des travaux ont rapporté que suite à une activation à l'IL-12, STAT4 se fixe au promoteur du gène de la perforine (Yamamoto, Shibata, Miyasaka, & Miura, 2002). Ces différentes études renforcent l'hypothèse d'un modèle cytotoxique dans lequel STAT4 se fixe au niveau du promoteur du gène *NCR3*, induit son expression et celles d'autres gènes impliqués dans la réponse cytotoxique, tels que le gène de la perforine.

Le facteur de transcription RUNX3 est fortement exprimé dans les cellules NK (S. Ohno et al., 2008), mais peu d'information sur sa fonction dans ces cellules sont connues. Néanmoins, des travaux ont montré que, chez la souris, la coopération RUNX3 avec les facteurs de transcription ETS et T-box régule l'activation médiée par l'interleukine-15 des cellules Natural Killer (Levanon et al., 2014). Par ailleurs, différentes études suggèrent une co-régulation des gènes *NCR1*, *NCR2* et *NCR3* (De Maria et al., 2003; Fauriat et al., 2007). Ainsi, comme il a été démontré que RUNX3 régule également l'expression *NCR1* (Lai & Mager, 2012) et que le facteur de transcription ETS-1 se lie lui aussi à une région spécifique et commune des promoteurs des différents *NCR* (Venton et al., 2016), on peut supposer que RUNX3 est l'un des facteurs impliqués dans la régulation coordonnée des trois *NCR*. Une autre observation intéressante est la régulation de l'expression du gène codant pour le récepteur KIR2DL4. En effet, il a été montré que l'expression de ce gène est régulé par la fixation des facteur de transcription ETS-1 et RUNX3 au niveau de son promoteur (Presnell, Zhang, Chlebowy, Al-Attar, & Lutz, 2012). Ainsi, il ne serait pas invraisemblable d'envisager une co-régulation des différents récepteurs activateurs médiée par ces facteurs sous l'action de différentes cytokines. Une façon de le vérifier, *in vitro*, serait d'éteindre ces facteurs par KO et de mesurer l'expression des gènes codant ces différents récepteurs.

2. L'ASSOCIATION DU VARIANT *NCR3-412* À LA RÉSISTANCE AU ACCÈS PALUSTRE SIMPLE EST-ELLE RÉPLIQUÉE DANS LA POPULATION DU CONGO ?

L'évidence d'une association entre *NCR3-412* et la forme simple du paludisme, n'ayant été démontré qu'une seule fois auparavant, nous avons souhaité confirmer l'implication du variant dans la résistance/susceptibilité au paludisme non compliqué en menant une étude de réplique dans une population indépendante.

Ainsi, les résultats obtenus ont confirmé que sous l'hypothèse d'un modèle génétique dominant, en accord avec l'étude menée au Burkina Faso, il existe une association significative entre le polymorphisme et la survenue de la maladie ainsi qu'entre le polymorphisme et le nombre d'accès fébrile.

Après avoir intégré dans l'analyse de régression multivariée les facteurs confondants connus pour avoir un effet sur le développement du paludisme simple, l'association du polymorphisme *NCR3-412* est toujours significativement associée. L'âge semble avoir un effet modulateur sur la susceptibilité de l'hôte au paludisme simple dans la population congolaise. En effet, après stratification de l'analyse en fonction de l'âge, les résultats montrent que le polymorphisme *NCR3-412* est associé au paludisme uniquement dans la sous-population d'individus âgés de plus de 4 ans. Ceci n'avait pas pu être montré dans l'étude burkinabé car la population étudiée était plus âgée (seulement 13 % des individus étaient âgés de moins de 5 ans contre 53,7 % dans la population du Congo).

Une hypothèse qu'on pourrait formuler pour expliquer pourquoi l'association du polymorphisme avec la maladie n'est pas retrouvée chez les individus de moins de 5 ans est une capacité réduite à produire des cytokines pro-inflammatoires, à l'origine de l'activation des facteurs de la transcription liant le promoteur de *NCR3*. En effet, il a déjà été montré que la capacité de production de certaines cytokines, et plus précisément celle de l'IL-12 évolue avec l'âge ([Härtel et al., 2005](#); [Yerkovich et al., 2007](#)). Chez les jeunes enfants la production d'IL-12 est réduite. Comme mentionné plus haut, cette cytokine est responsable de l'activation de *STAT4*, de laquelle résulte une réponse

cytotoxique des NK, une production d'IFN- γ et une prolifération des NK au repos (Thierfelder et al., 1996; K. S. Wang et al., 2000, 1999). Ainsi, chez les enfants de moins de 5 ans, une sous-production d'IL-12 ne permettrait pas à STAT4 et, peut-être RUNX3 d'être activés et de lier le promoteur où se trouve le polymorphisme. Quel que soit l'allèle, NCR3-412 ne modifierait donc ni la fixation du facteur au niveau du promoteur, ni le niveau d'expression de NCR3. En revanche chez les individus de plus de 4 ans, la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages serait plus importante et par conséquent suffisante pour activer les facteurs de la transcription qui seraient alors en mesure de lier le promoteur de NCR3 au niveau de la séquence contenant le polymorphisme. Ainsi, selon le génotype de l'individu les facteurs se fixeraient avec plus ou moins d'affinité, ce qui aurait une répercussion sur l'expression de NKp30 à la surface des NK, leur capacité à lyser les érythrocytes parasités et donc la susceptibilité de l'hôte à développer un accès palustre (Fig. 30).

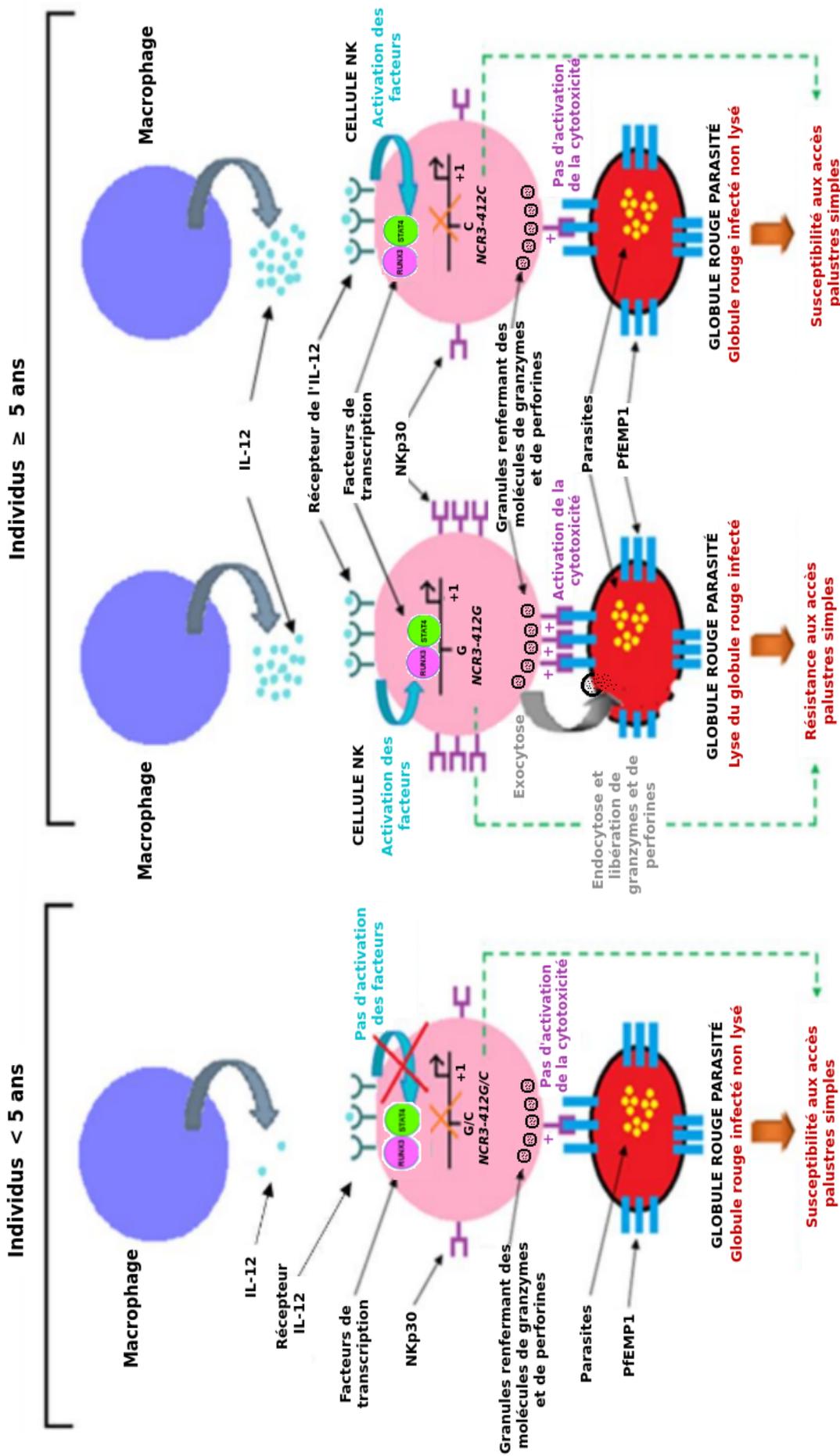


Fig. 30. Modèle biologique décrivant l'effet modulateur hypothétique de l'âge sur l'association du NCR3-412 avec la forme simple du paludisme. Chez les enfants de moins de 5 ans, la capacité de production d'IL-12 est réduite. La faible quantité d'IL-12 produite ne permet pas l'activation des facteurs STAT4 et RUNX3. Ces facteurs n'étant pas activés, ne lient pas le promoteur du gène NCR3 présentant le polymorphisme. Ainsi, quel que soit le génotype du variant NCR3-412, il ne modifie ni la liaison des facteurs de la transcription, ni l'expression du gène. En revanche, chez les individus de plus de 4 ans, la production d'IL-12 est suffisante pour activer les facteurs STAT4 et RUNX3. Ces facteurs, une fois activés, sont capables de se fixer dans la région promotrice de NCR3 différenciellement, selon qu'elle présente le variant G ou C ; ce qui conduirait à l'un ou l'autre des phénotypes de résistance ou susceptibilité au paludisme

3. LE VARIANT *NCR3-412* N'EST PAS ASSOCIÉ AU PALUDISME SÉVÈRE DANS LA POPULATION SÉNÉGALAISE : EST-IL POSSIBLE QU'IL SOIT TOUT DE MÊME UN VARIANT CAUSAL ?

Le pic de liaison 6p21-p23 détecté chez l'homme sont synténiques des pics de liaison des loci *char3* et *cmsc* chez la souris qui semblent représenter un seul et même locus lié génétiquement à la fois à la parasitémie et au neuropaludisme (Min-Oo et al., 2003; T. Ohno & Nishimura, 2004). Le locus *char3* est impliqué dans le contrôle de la parasitémie à *P. chabaudi* (Min-Oo et al., 2003) tandis que le locus *cmsc* est impliqué dans le contrôle du neuropaludisme à *P. berghei* ANKA (T. Ohno & Nishimura, 2004). Ceci suggère que cette région pourrait être impliqué à la fois dans le contrôle des formes non compliquées et des formes graves du paludisme murin, mais aussi que la région synténique humaine 6p21-p23 est aussi impliquée dans le contrôle des formes simples et sévère du paludisme chez l'homme. Les diverses associations des gènes *TNF*, *HLA-B* et *HLA-DR* avec à la fois les formes simples mais aussi avec les formes sévères du paludisme humain vont dans ce sens (Diakite et al., 2009; H. Hananantachai et al., 2007; Hathairad Hananantachai et al., 2005; Yamazaki et al., 2011). Ainsi, il est envisageable qu'au sein de cette région, il existe des gènes de résistance impliqués à la fois dans les formes simples et graves du paludisme, et/ou des gènes de résistance impliqués spécifiquement dans les formes non compliquées du paludisme et des gènes de résistance impliqués spécifiquement dans les formes graves du paludisme.

Ainsi, dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'implication du variant *NCR3-412* dans les formes sévères du paludisme dans une cohorte recrutée au Sénégal. Nous n'avons détecté aucune différence significative de la fréquence allélique de *NCR3-412* entre les individus atteints de formes simples et les individus atteints de formes compliquées (neuropaludisme, forme grave non cérébrale ou toutes formes graves confondues). Sur la base d'un effet correspondant à celui des études sur le paludisme simple au Burkina Faso et au Congo, les études de puissance ont révélé une puissance d'environ 85 %. Cela suggère que soit l'ampleur de l'effet est significativement plus

faible pour le paludisme grave, soit qu'il n'y a pas d'association entre le SNP et le paludisme grave.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer pourquoi ce variant, dont nous avons montré le rôle *cis*-régulateur, est retrouvé associé aux formes simples mais pas aux formes sévères est la stratégie d'analyse utilisée pour identifier une association dans les formes sévères (Fig. 31). En effet, afin de détecter des gènes pouvant expliquer pourquoi certains individus développent des accès palustres simples alors que d'autres restent asymptomatiques, une comparaison entre ces deux groupes d'individus est effectuée. C'est le cas des études conduites au Burkina Faso et au Congo qui ont démontré que le gène *NCR3* permet de contrôler les accès palustres simples. Lors de l'étude conduite au Sénégal, nous avons comparé les individus présentant des accès palustres simples et les individus présentant des accès palustres sévères. Dans ce cas-là, nous ne détectons pas d'association non pas parce que le gène n'a pas d'effet protecteur/aggravant vis-à-vis de l'infection palustre mais parce que le gène n'explique pas une différence entre les accès simples et sévères.

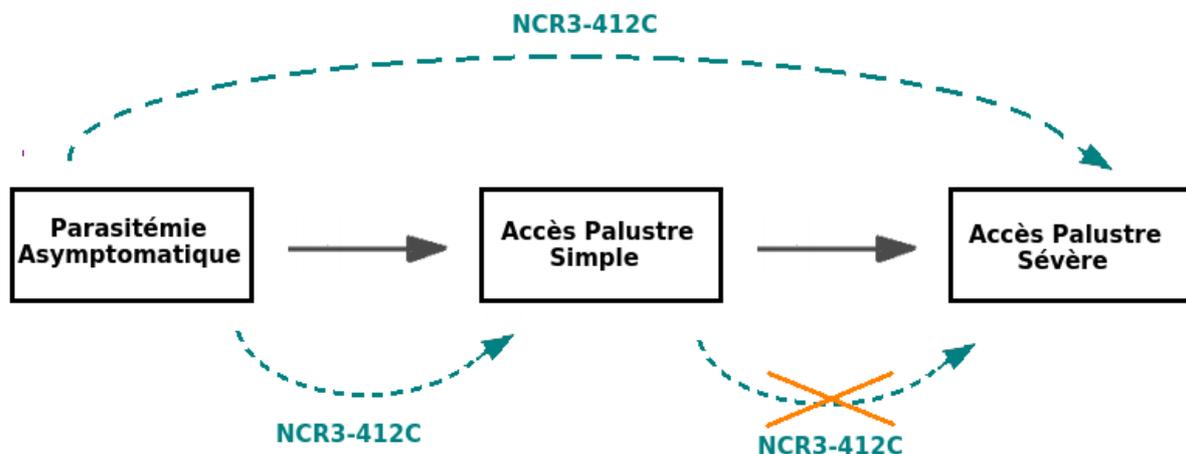


Fig. 31. Du portage asymptomatique aux accès sévères : implication potentiel du gène *NCR3*. Le variant *NCR3-412C* est impliqué dans la propension à développer un accès palustre simple ; il n'explique cependant pas pourquoi certains individus présentant un accès simple vont développer un accès sévère. Il pourrait cependant expliquer pourquoi certains individus sont porteurs asymptomatique et d'autres développent des accès sévères.

Le modèle biologique du *TNF* est différent. Si nous nous intéressons au gène et à son expression (et non pas aux variants dont les résultats sont controversés), un haut niveau de production de *TNF* est associé négativement à la parasitémie asymptomatique (et symptomatique) car il permet de contrôler la clairance

parasitaire, il est associé positivement à la survenue du paludisme simple car cette cytokine pyrogène va stimuler les régions thermorégulatrices de l'hypothalamus et provoquer la fièvre, et il est associé positivement au neuropaludisme car il va favoriser l'inflammation de l'endothélium vasculaire cérébral et favoriser aussi la séquestration de globules rouges parasité en stimulant une sur-expression d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales. Ainsi, il est possible d'observer l'effet du *TNF* lors d'une comparaison entre les individus atteints de paludisme non compliqués et les individus atteints de paludisme sévère (Fig. 32).

Au-delà, du variant *NCR3-412* impliqué dans la résistance à la forme simple du paludisme mais dont nous n'avons pas détecté d'association avec les formes sévères, il serait intéressant de conduire une étude *ex-vivo* permettant de corréler l'expression de NKp30 à la surface des cellules NK aux différents phénotypes asymptomatique, simple et sévère, afin de renforcer l'hypothèse du rôle de NKp30 dans le contrôle de l'infection palustre. Ces études sont envisageables dans la population du Sénégal, compte-tenu de l'expression constitutive élevée de ce récepteur révélé par les analyses de cytométrie réalisées auprès des 12 témoins sénégalais. Ainsi, il serait envisageable de corréler le génotype *NCR3-412* avec l'expression du gène à un niveau transcriptionnel et protéique, et enfin de l'associer aux différents phénotypes palustres.

Il serait également intéressant de regarder les différents polymorphismes des récepteurs activateurs et inhibiteurs de ces cellules et d'intégrer ces différents éléments génétiques dans le but de modéliser l'activation de la réponse immunitaire des cellules NK dirigée contre l'infection palustre.

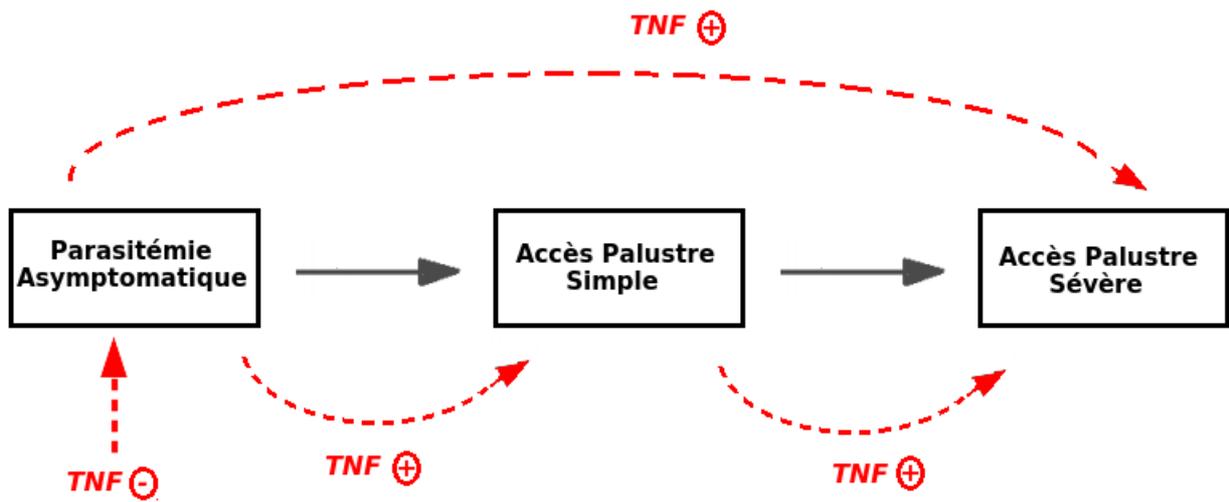


Fig. 32. Du portage asymptomatique aux accès sévères : implication du gène TNF. La dualité du TNF explique qu'on le retrouve impliqué négativement dans le contrôle de la parasitémie asymptomatique, mais aussi positivement dans les formes simples par sa fonction dans le déclenchement de la fièvre et dans les formes sévères par son rôle dans la séquestration des globules rouges infectés au niveau de la paroi des vaisseaux endothéliaux et l'endommagement de cette paroi. Ainsi, ce gène explique non seulement pourquoi certains individus sont porteurs asymptomatiques et d'autres développent des accès sévères mais aussi pourquoi certains individus présentant un accès simple vont développer un accès sévère.

CONCLUSION

Malgré le recul du paludisme suite aux différentes stratégies mondiales d'éradication, cette maladie infectieuse multifactorielle reste un immense fardeau de santé publique avec 212 millions de cas et 429 000 décès associés en 2015. Le concept du contrôle génétique de l'infection palustre a été proposé par Haldane en 1949 qui proposait que la fréquence élevée des hémoglobinopathies dans les zones où le paludisme est endémique serait due au fait qu'elles confèreraient une résistance au paludisme. Depuis, de nombreuses études génétiques et fonctionnelles ont été conduites afin d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans la protection contre l'infection. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ce cadre.

En effet, une étude de liaison pangénomique conduite au Burkina Faso par notre équipe, a mis en évidence une liaison significative entre le locus 6p21-p23 au niveau du CMH de classe I et la forme simple du paludisme. Plusieurs polymorphismes retrouvés sous le pic de liaison, et plus particulièrement des variants du gène *TNF* et *NCR3* ont été indépendamment associés aux différents sous-phénotypes du paludisme non compliqué tels que la parasitémie maximale symptomatique et les accès palustres simples.

Ainsi, au cours de ma thèse je me suis intéressée à ces polymorphismes dans une population indépendante du Congo, dont peu de données génétiques en lien avec des infections sont disponibles. Par des approches génétiques, bioinformatiques et fonctionnelles, j'ai pu confirmer l'association des polymorphismes du *TNF* (plus précisément *TNF-244*) et du *NCR3* (*NCR3-412*) avec la parasitémie maximale symptomatique et les accès palustres simples, et proposer des modèles biologiques expliquant l'association de ces SNP avec les phénotypes palustres.

Une étude conduite au Sénégal, n'a pas permis de détecter d'association du polymorphisme du *NCR3-412* avec les phénotypes sévères, néanmoins elle a permis de confirmer une corrélation entre certains paramètres clinique et le paludisme sévère, telle qu'une réduction significative du nombre de plaquettes chez les patients atteints de paludisme sévère mais aussi une augmentation significative du nombre de leucocytes chez les patients atteints neuropaludisme par rapport à ceux atteints de paludisme non compliqué. Cette étude a aussi permis de montrer une expression constitutive élevée de NKp30 à la surface des cellules NK dans la population sénégalaise, ce qui permet d'envisager une étude

de corrélation entre l'expression de ces récepteurs et la résistance aux différentes formes du paludisme.

Dans leur ensemble, nos travaux s'inscrivent dans un projet de clonage positionnel. À partir d'une étude pangénomique à la recherche de variants génétiques potentiellement causaux, nous avons non seulement montré l'implication de variants dans la pathologie palustre et démontré leurs fonctions régulatrices, mais aussi, nous avons pu proposer différents modèles biologiques à valider. Nos travaux illustrent tout l'intérêt de ce type d'approches dans la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance au paludisme.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdi, A. I., Hodgson, S. H., Muthui, M. K., Kivisi, C. A., Kamuyu, G., Kimani, D., ... Bull, P. C. (2017). Plasmodium falciparum malaria parasite var gene expression is modified by host antibodies: longitudinal evidence from controlled infections of Kenyan adults with varying natural exposure. *BMC Infectious Diseases*, *17*(1), 585. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2686-0>
- Aidoo, M., McElroy, P. D., Kolczak, M. S., Terlouw, D. J., ter Kuile, F. O., Nahlen, B., ... Udhayakumar, V. (2001). Tumor necrosis factor-alpha promoter variant 2 (TNF2) is associated with pre-term delivery, infant mortality, and malaria morbidity in western Kenya: Asembo Bay Cohort Project IX. *Genetic Epidemiology*, *21*(3), 201-211. <https://doi.org/10.1002/gepi.1029>
- Alles, H. K., Mendis, K. N., & Carter, R. (1998). Malaria mortality rates in South Asia and in Africa: implications for malaria control. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, *14*(9), 369-375.
- Allison, A. C. (2009). Genetic control of resistance to human malaria. *Current Opinion in Immunology*, *21*(5), 499-505. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.04.001>
- Alves, F. P., Durlacher, R. R., Menezes, M. J., Krieger, H., Silva, L. H. P., & Camargo, E. P. (2002). High prevalence of asymptomatic Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum infections in native Amazonian populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *66*(6), 641-648.
- Alves, F. P., Gil, L. H. S., Marrelli, M. T., Ribolla, P. E. M., Camargo, E. P., & Da Silva, L. H. P. (2005). Asymptomatic carriers of Plasmodium spp. as infection source for malaria vector mosquitoes in the Brazilian Amazon. *Journal of Medical Entomology*, *42*(5), 777-779.
- Amaratunga, C., Lopera-Mesa, T. M., Brittain, N. J., Cholera, R., Arie, T., Fujioka, H., ... Fairhurst, R. M. (2011). A role for fetal hemoglobin and maternal immune IgG in infant resistance to Plasmodium falciparum malaria. *PLoS One*, *6*(4), e14798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014798>
- Amodu, O. K., Gbadegesin, R. A., Ralph, S. A., Adeyemo, A. A., Brenchley, P. E. C., Ayoola, O. O., ... Omotade, O. O. (2005). Plasmodium falciparum malaria in south-west Nigerian children: is the polymorphism of ICAM-1 and E-selectin genes contributing to the clinical severity of malaria? *Acta Tropica*, *95*(3), 248-255. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.05.011>
- Anstey, N. M., Douglas, N. M., Poespoprodjo, J. R., & Price, R. N. (2012). Plasmodium vivax: clinical spectrum, risk factors and pathogenesis. *Advances in Parasitology*, *80*, 151-201. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397900-1.00003-7>

- Anyona, S. B., Kempaiah, P., Raballah, E., Davenport, G. C., Were, T., Konah, S. N., ... Perkins, D. J. (2012). Reduced systemic bicyclo-prostaglandin-E2 and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia. *American Journal of Hematology*, 87(8), 782-789. <https://doi.org/10.1002/ajh.23253>
- Anyona, S. B., Kempaiah, P., Raballah, E., Ouma, C., Were, T., Davenport, G. C., ... Perkins, D. J. (2011). Functional promoter haplotypes of interleukin-18 condition susceptibility to severe malarial anemia and childhood mortality. *Infection and Immunity*, 79(12), 4923-4932. <https://doi.org/10.1128/IAI.05601-11>
- Artavanis-Tsakonas, K., Eleme, K., McQueen, K. L., Cheng, N. W., Parham, P., Davis, D. M., & Riley, E. M. (2003). Activation of a subset of human NK cells upon contact with Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 171(10), 5396-5405.
- Artavanis-Tsakonas, K., & Riley, E. M. (2002). Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(6), 2956-2963.
- Aste-Amezaga, M., D'Andrea, A., Kubin, M., & Trinchieri, G. (1994). Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cellular Immunology*, 156(2), 480-492. <https://doi.org/10.1006/cimm.1994.1192>
- Atkinson, A., Barbier, M., Afridi, S., Fumoux, F., & Rihet, P. (2011). Evidence for epistasis between hemoglobin C and immune genes in human P. falciparum malaria: a family study in Burkina Faso. *Genes and Immunity*, 12(6), 481-489. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.19>
- Atkinson, S. H., Uyoga, S. M., Nyatichi, E., Macharia, A. W., Nyutu, G., Ndila, C., ... Williams, T. N. (2014). Epistasis between the haptoglobin common variant and α -thalassemia influences risk of severe malaria in Kenyan children. *Blood*, 123(13), 2008-2016. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-533489>
- Aucan, C., Traoré, Y., Tall, F., Nacro, B., Traoré-Leroux, T., Fumoux, F., & Rihet, P. (2000). High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria. *Infection and Immunity*, 68(3), 1252-1258.
- Aucan, C., Walley, A. J., Hennig, B. J. W., Fitness, J., Frodsham, A., Zhang, L., ... Hill, A. V. S. (2003). Interferon-alpha receptor-1 (IFNAR1) variants are associated with protection against cerebral malaria in the Gambia. *Genes and Immunity*, 4(4), 275-282. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363962>
- Autino, B., Noris, A., Russo, R., & Castelli, F. (2012). Epidemiology of Malaria in Endemic Areas. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1). <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.060>

- Avery, D. T., Kalled, S. L., Ellyard, J. I., Ambrose, C., Bixler, S. A., Thien, M., ... Tangye, S. G. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(2), 286-297. <https://doi.org/10.1172/JCI18025>
- Awah, N. W., Troye-Blomberg, M., Berzins, K., & Gysin, J. (2009). Mechanisms of malarial anaemia: potential involvement of the Plasmodium falciparum low molecular weight rhoptry-associated proteins. *Acta Tropica*, 112(3), 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.08.017>
- Baldwin, M. R., Li, X., Hanada, T., Liu, S.-C., & Chishti, A. H. (2015). Merozoite surface protein 1 recognition of host glycoporphin A mediates malaria parasite invasion of red blood cells. *Blood*, 125(17), 2704-2711. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-611707>
- Baragaña, B., Hallyburton, I., Lee, M. C. S., Norcross, N. R., Grimaldi, R., Otto, T. D., ... Gilbert, I. H. (2015). A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature*, 522(7556), 315-320. <https://doi.org/10.1038/nature14451>
- Baratin, M., Roetyneck, S., Lépolard, C., Falk, C., Sawadogo, S., Uematsu, S., ... Ugolini, S. (2005). Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to Plasmodium falciparum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14747-14752. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507355102>
- Baratin, M., Roetyneck, S., Pouvelle, B., Lemmers, C., Viebig, N. K., Johansson, S., ... Ugolini, S. (2007). Dissection of the role of PfEMP1 and ICAM-1 in the sensing of Plasmodium-falciparum-infected erythrocytes by natural killer cells. *PloS One*, 2(2), e228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000228>
- Barber, B. E., William, T., Grigg, M. J., Menon, J., Auburn, S., Marfurt, J., ... Yeo, T. W. (2013). A prospective comparative study of knowlesi, falciparum, and vivax malaria in Sabah, Malaysia: high proportion with severe disease from Plasmodium knowlesi and Plasmodium vivax but no mortality with early referral and artesunate therapy. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(3), 383-397. <https://doi.org/10.1093/cid/cis902>
- Barbi, J., Pardoll, D., & Pan, F. (2013). Metabolic control of the Treg/Th17 axis. *Immunological Reviews*, 252(1), 52-77. <https://doi.org/10.1111/imr.12029>
- Barbier, M., Atkinson, A., Fumoux, F., & Rihet, P. (2008). IL12B polymorphisms are linked but not associated with Plasmodium falciparum parasitemia: a familial study in Burkina Faso. *Genes and Immunity*, 9(5), 405-411. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.31>

- Bassat, Q., & Alonso, P. L. (2011). Defying malaria: Fathoming severe *Plasmodium vivax* disease. *Nature Medicine*, *17*(1), 48-49. <https://doi.org/10.1038/nm0111-48>
- Basu, M., Maji, A. K., Chakraborty, A., Banerjee, R., Mullick, S., Saha, P., ... Sengupta, S. (2010). Genetic association of Toll-like-receptor 4 and tumor necrosis factor-alpha polymorphisms with *Plasmodium falciparum* blood infection levels. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *10*(5), 686-696. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.008>
- Bayley, J. P., de Rooij, H., van den Elsen, P. J., Huizinga, T. W., & Verweij, C. L. (2001). Functional analysis of linker-scan mutants spanning the -376, -308, -244, and -238 polymorphic sites of the TNF-alpha promoter. *Cytokine*, *14*(6), 316-323. <https://doi.org/10.1006/cyto.2001.0902>
- Behr, C., & Dubois, P. (1992). Preferential expansion of V gamma 9 V delta 2 T cells following stimulation of peripheral blood lymphocytes with extracts of *Plasmodium falciparum*. *International Immunology*, *4*(3), 361-366.
- Bellamy, R., Kwiatkowski, D., & Hill, A. V. (1998). Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *92*(3), 312-316.
- Bereczky, S., Montgomery, S. M., Troye-Blomberg, M., Rooth, I., Shaw, M.-A., & Färnert, A. (2004). Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria. *International Journal for Parasitology*, *34*(8), 935-942. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.04.007>
- Besteiro, S., Dubremetz, J.-F., & Lebrun, M. (2011). The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. *Cellular Microbiology*, *13*(6), 797-805. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01597.x>
- Bhanot, P., Schauer, K., Coppens, I., & Nussenzweig, V. (2005). A surface phospholipase is involved in the migration of *Plasmodium* sporozoites through cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(8), 6752-6760. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411465200>
- Bijker, E. M., Teirlinck, A. C., Schats, R., van Gemert, G.-J., van de Vegte-Bolmer, M., van Lieshout, L., ... Sauerwein, R. W. (2014). Cytotoxic markers associate with protection against malaria in human volunteers immunized with *Plasmodium falciparum* sporozoites. *The Journal of Infectious Diseases*, *210*(10), 1605-1615. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu293>

- Billker, O., Lindo, V., Panico, M., Etienne, A. E., Paxton, T., Dell, A., ... Morris, H. R. (1998). Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature*, 392(6673), 289-292. <https://doi.org/10.1038/32667>
- Birkett, A. J. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for malaria. *Vaccine*, 34(26), 2915-2920. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.074>
- Black, W. C., Alphey, L., & James, A. A. (2011). Why RIDL is not SIT. *Trends in Parasitology*, 27(8), 362-370. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.004>
- Blanca, I. R., Bere, E. W., Young, H. A., & Ortaldo, J. R. (2001). Human B Cell Activation by Autologous NK Cells Is Regulated by CD40-CD40 Ligand Interaction: Role of Memory B Cells and CD5+ B Cells. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6132-6139. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6132>
- Boddey, J. A., & Cowman, A. F. (2013). Plasmodium nesting: remaking the erythrocyte from the inside out. *Annual Review of Microbiology*, 67, 243-269. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155730>
- Boeuf, P. S., Loizon, S., Awandare, G. A., Tetteh, J. K. A., Addae, M. M., Adjei, G. O., ... Behr, C. (2012). Insights into deregulated TNF and IL-10 production in malaria: implications for understanding severe malarial anaemia. *Malaria Journal*, 11, 253. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-253>
- Bogdan, C., Paik, J., Vodovotz, Y., & Nathan, C. (1992). Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(32), 23301-23308.
- Boisier, P., Jambou, R., Raharimalala, L., & Roux, J. (2002). Relationship between parasite density and fever risk in a community exposed to a low level of malaria transmission in Madagascar highlands. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67(2), 137-140.
- Borges da Silva, H., Fonseca, R., Cassado, A. D. A., Machado de Salles, É., de Menezes, M. N., Langhorne, J., ... Tadokoro, C. E. (2015). In vivo approaches reveal a key role for DCs in CD4+ T cell activation and parasite clearance during the acute phase of experimental blood-stage malaria. *PLoS Pathogens*, 11(2), e1004598. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004598>
- Böttger, E., Multhoff, G., Kun, J. F. J., & Esen, M. (2012). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce granzyme B by NK cells through expression of host-Hsp70. *PloS One*, 7(3), e33774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033774>

- Bottius, E., Guanzirolli, A., Trape, J. F., Rogier, C., Konate, L., & Druilhe, P. (1996). Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *90*(1), 15-19.
- Bouharoun-Tayoun, H., & Druilhe, P. (1992). Antibodies in falciparum malaria: what matters most, quantity or quality? *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *87 Suppl 3*, 229-234.
- Bouharoun-Tayoun, H., Oeuvray, C., Lunel, F., & Druilhe, P. (1995). Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*(2), 409-418.
- Bourtzis, K., Lees, R. S., Hendrichs, J., & Vreysen, M. J. B. (2016). More than one rabbit out of the hat: Radiation, transgenic and symbiont-based approaches for sustainable management of mosquito and tsetse fly populations. *Acta Tropica*, *157*, 115-130. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.009>
- Boutlis, C. S., Tjitra, E., Maniboey, H., Misukonis, M. A., Saunders, J. R., Suprianto, S., ... Anstey, N. M. (2003). Nitric oxide production and mononuclear cell nitric oxide synthase activity in malaria-tolerant Papuan adults. *Infection and Immunity*, *71*(7), 3682-3689.
- Bouyou-Akotet, M. K., Issifou, S., Meye, J. F., Kombila, M., Ngou-Milama, E., Luty, A. J. F., ... Mavoungou, E. (2004). Depressed natural killer cell cytotoxicity against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes during first pregnancies. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *38*(3), 342-347. <https://doi.org/10.1086/380646>
- Boyle, M. J., Reiling, L., Feng, G., Langer, C., Osier, F. H., Aspling-Jones, H., ... Beeson, J. G. (2015). Human antibodies fix complement to inhibit Plasmodium falciparum invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. *Immunity*, *42*(3), 580-590. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.012>
- Boyle, M. J., Richards, J. S., Gilson, P. R., Chai, W., & Beeson, J. G. (2010). Interactions with heparin-like molecules during erythrocyte invasion by Plasmodium falciparum merozoites. *Blood*, *115*(22), 4559-4568. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-243725>
- Brabin, B. J. (2014). Malaria's contribution to World War One – the unexpected adversary. *Malaria Journal*, *13*. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-497>
- Branch, O., Casapia, W. M., Gamboa, D. V., Hernandez, J. N., Alava, F. F., Roncal, N., ... Gotuzzo, E. (2005). Clustered local transmission and asymptomatic Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax malaria infections in a recently emerged, hypoendemic Peruvian Amazon community. *Malaria Journal*, *4*, 27. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-4-27>

- Brinkman, B. M., Zuijdeest, D., Kaijzel, E. L., Breedveld, F. C., & Verweij, C. L. (1995). Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *Journal of Inflammation*, 46(1), 32-41.
- Brisebarre, A., Kumulungui, B., Sawadogo, S., Atkinson, A., Garnier, S., Fumoux, F., & Rihet, P. (2014). A genome scan for Plasmodium falciparum malaria identifies quantitative trait loci on chromosomes 5q31, 6p21.3, 17p12, and 19p13. *Malaria Journal*, 13, 198. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-198>
- Bruce-Chwatt, L. J. (1965). Paleogenesis and paleo-epidemiology of primate malaria. *Bulletin of the World Health Organization*, 32, 363-387.
- Bruce-Chwatt, L. J. (1988). History of malaria from prehistory to eradication. In *Malaria. Principles and Practice of Malariology* (Wernsdorfer WH, McGregor I, Vol. 1, p. 1-59). Edinburgh, United Kingdom: Churchill Livingstone.
- Bruce-Chwatt, L. J., & De Zulueta, J. (1980). *The rise and fall of malaria in Europe: a historico-epidemiological study*. Oxford: Oxford University Press.
- Bruña-Romero, O., & Rodriguez, A. (2001). Dendritic cells can initiate protective immune responses against malaria. *Infection and Immunity*, 69(8), 5173-5176. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5173-5176.2001>
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G., & Long, E. O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107(1), 159-166. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1351>
- Buffet, P. A., Safeukui, I., Deplaine, G., Brousse, V., Prendki, V., Thellier, M., ... Mercereau-Puijalon, O. (2011). The pathogenesis of Plasmodium falciparum malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*, 117(2), 381-392. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-202911>
- Buffet, P. A., Safeukui, I., Milon, G., Mercereau-Puijalon, O., & David, P. H. (2009). Retention of erythrocytes in the spleen: a double-edged process in human malaria. *Current Opinion in Hematology*, 16(3), 157-164. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32832a1d4b>
- Bujila, I., Schwarzer, E., Skorokhod, O., Weidner, J. M., Troye-Blomberg, M., & Östlund Farrants, A.-K. (2016). Malaria-derived hemozoin exerts early modulatory effects on the phenotype and maturation of human dendritic cells. *Cellular Microbiology*, 18(3), 413-423. <https://doi.org/10.1111/cmi.12521>
- Bull, J. J., & Turelli, M. (2013). Wolbachia versus dengue: Evolutionary forecasts. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2013(1), 197-207. <https://doi.org/10.1093/emph/eot018>

- Burt, A. (2014). Heritable strategies for controlling insect vectors of disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1645), 20130432.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0432>
- Butler, N. S., Moebius, J., Pewe, L. L., Traore, B., Doumbo, O. K., Tygrett, L. T., ... Harty, J. T. (2011). Therapeutic blockade of PD-L1 and LAG-3 rapidly clears established blood-stage Plasmodium infection. *Nature Immunology*, 13(2), 188-195. <https://doi.org/10.1038/ni.2180>
- Cabantous, S., Poudiougou, B., Traore, A., Keita, M., Cisse, M. B., Doumbo, O., ... Marquet, S. (2005). Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(5), 854-860. <https://doi.org/10.1086/432484>
- Cabezón Estévez, I., & Górgolas Hernández-Mora, M. (2016). Pulmonary complications of malaria: An update. *Medicina Clínica (English Edition)*, 146(8), 354-358. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2016.06.017>
- Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Rossi, S., Montecchini, S., Dell'Anna, M. L., ... Arcangeletti, M. C. (2013). Accurate identification of the six human Plasmodium spp. causing imported malaria, including Plasmodium ovale wallikeri and Plasmodium knowlesi. *Malaria Journal*, 12, 321. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-12-321>
- Calissano, C., Modiano, D., Sirima, B. S., Konate, A., Sanou, I., Sawadogo, A., ... Perlmann, P. (2003). IgE antibodies to Plasmodium falciparum and severity of malaria in children of one ethnic group living in Burkina Faso. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(1), 31-35.
- Capanna, E. (2006). Grassi versus Ross: who solved the riddle of malaria? *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 9(1), 69-74.
- Carter, R., & Mendis, K. N. (2002). Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 564-594. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.564-594.2002>
- Carvalho, L. H., Sano, G.-I., Hafalla, J. C. R., Morrot, A., Curotto de Lafaille, M. A., & Zavala, F. (2002). IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. *Nature Medicine*, 8(2), 166-170. <https://doi.org/10.1038/nm0202-166>
- Caulfield, L. E., Richard, S. A., & Black, R. E. (2004). *Undernutrition as an Underlying Cause of Malaria Morbidity and Mortality in Children Less Than Five Years Old*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Consulté à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3766/>
- Celli, A., & Celli-Fraentzel, A. (1933). *The History of Malaria in the Roman Campagna from Ancient Times*. London: John Bale, Sons & Danielsson, Ltd.

- Cerutti, C., Boulos, M., Coutinho, A. F., Hatab, M. do C. L. D., Falqueto, A., Rezende, H. R., ... Malafronte, R. S. (2007). Epidemiologic aspects of the malaria transmission cycle in an area of very low incidence in Brazil. *Malaria Journal*, 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-33>
- Chakravarty, S., Baldeviano, G. C., Overstreet, M. G., & Zavala, F. (2008). Effector CD8+ T lymphocytes against liver stages of *Plasmodium yoelii* do not require gamma interferon for antiparasite activity. *Infection and Immunity*, 76(8), 3628-3631. <https://doi.org/10.1128/IAI.00471-08>
- Chakravarty, S., Cockburn, I. A., Kuk, S., Overstreet, M. G., Sacci, J. B., & Zavala, F. (2007). CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nature Medicine*, 13(9), 1035-1041. <https://doi.org/10.1038/nm1628>
- Chan, J.-A., Fowkes, F. J. I., & Beeson, J. G. (2014). Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(19), 3633-3657. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1614-3>
- Chang, K.-H., Tam, M., & Stevenson, M. M. (2004). Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. *Blood*, 103(10), 3727-3735. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2887>
- Charlton, J. J., Chatzidakis, I., Tsoukatou, D., Boumpas, D. T., Garinis, G. A., & Mamalaki, C. (2013). Programmed death-1 shapes memory phenotype CD8 T cell subsets in a cell-intrinsic manner. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(12), 6104-6114. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201617>
- Chen, Q., Amaladoss, A., Ye, W., Liu, M., Dummler, S., Kong, F., ... Chen, J. (2014). Human natural killer cells control *Plasmodium falciparum* infection by eliminating infected red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1479-1484. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323318111>
- Chen, Q., Schlichtherle, M., & Wahlgren, M. (2000). Molecular aspects of severe malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 439-450.
- Chen, Z., Laurence, A., & O'Shea, J. J. (2007). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. *Seminars in Immunology*, 19(6), 400-408. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.10.015>
- Chin, W., Contacos, P. G., Coatney, G. R., & Kimball, H. R. (1965). A naturally acquired quotidian-type malaria in man transferable to monkeys. *Science (New York, N.Y.)*, 149(3686), 865.

- Chotivanich, K., Udomsangpetch, R., Simpson, J. A., Newton, P., Pukrittayakamee, S., Looareesuwan, S., & White, N. J. (2000). Parasite multiplication potential and the severity of *Falciparum* malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, *181*(3), 1206-1209. <https://doi.org/10.1086/315353>
- Choudhury, H. R., Sheikh, N. A., Bancroft, G. J., Katz, D. R., & De Souza, J. B. (2000). Early nonspecific immune responses and immunity to blood-stage nonlethal *Plasmodium yoelii* malaria. *Infection and Immunity*, *68*(11), 6127-6132.
- Chua, H. L., Serov, Y., & Brahmī, Z. (2004). Regulation of FasL expression in natural killer cells. *Human Immunology*, *65*(4), 317-327. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.01.004>
- Claessens, A., Hamilton, W. L., Kekre, M., Otto, T. D., Faizullabhoj, A., Rayner, J. C., & Kwiatkowski, D. (2014). Generation of antigenic diversity in *Plasmodium falciparum* by structured rearrangement of Var genes during mitosis. *PLoS Genetics*, *10*(12), e1004812. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004812>
- Clark, T. G., Diakite, M., Auburn, S., Campino, S., Fry, A. E., Green, A., ... Kwiatkowski, D. P. (2009). Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha polymorphisms and severe malaria in African populations. *The Journal of Infectious Diseases*, *199*(4), 569-575. <https://doi.org/10.1086/596320>
- Clatworthy, M. R., Willcocks, L., Urban, B., Langhorne, J., Williams, T. N., Peshu, N., ... Smith, K. G. C. (2007). Systemic lupus erythematosus-associated defects in the inhibitory receptor FcγRIIb reduce susceptibility to malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(17), 7169-7174. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608889104>
- Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., ... Akira, S. (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*(1), 19-25. <https://doi.org/10.1084/jem.20041836>
- Coban, C., Ishii, K. J., Sullivan, D. J., & Kumar, N. (2002). Purified malaria pigment (hemozoin) enhances dendritic cell maturation and modulates the isotype of antibodies induced by a DNA vaccine. *Infection and Immunity*, *70*(7), 3939-3943.
- Cockburn, I. A., Amino, R., Kelemen, R. K., Kuo, S. C., Tse, S.-W., Radtke, A., ... Ménard, R. (2013). In vivo imaging of CD8⁺ T cell-mediated elimination of malaria liver stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(22), 9090-9095. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303858110>
- Cohen, S., McGregor, I. A., & Carrington, S. (1961). Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*, *192*, 733-737.

- Collins, C. R., Hackett, F., Strath, M., Penzo, M., Withers-Martinez, C., Baker, D. A., & Blackman, M. J. (2013). Malaria parasite cGMP-dependent protein kinase regulates blood stage merozoite secretory organelle discharge and egress. *PLoS Pathogens*, *9*(5), e1003344. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003344>
- Collins, W. E., & Jeffery, G. M. (2007). Plasmodium malariae: Parasite and Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(4), 579-592. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-07>
- Conduct, C. on G. D. R. in N.-H. O. R. for R., Sciences, B. on L., Studies, D. on E. and L., & National Academies of Sciences, E. (2016). *COMMITTEE ON GENE DRIVE RESEARCH IN NON-HUMAN ORGANISMS: RECOMMENDATIONS FOR RESPONSIBLE CONDUCT*. National Academies Press (US). Consulté à l'adresse <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK379286/>
- Cooke, G. S., Aucan, C., Walley, A. J., Segal, S., Greenwood, B. M., Kwiatkowski, D. P., & Hill, A. V. S. (2003). Association of Fcγ receptor IIa (CD32) polymorphism with severe malaria in West Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *69*(6), 565-568.
- Coomes, S. M., Pelly, V. S., & Wilson, M. S. (2013). Plasticity within the αβ⁺CD4⁺ T-cell lineage: when, how and what for? *Open Biology*, *3*(1), 120157. <https://doi.org/10.1098/rsob.120157>
- Coppi, A., Natarajan, R., Pradel, G., Bennett, B. L., James, E. R., Roggero, M. A., ... Sinnis, P. (2011). The malaria circumsporozoite protein has two functional domains, each with distinct roles as sporozoites journey from mosquito to mammalian host. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(2), 341-356. <https://doi.org/10.1084/jem.20101488>
- Coppi, A., Tewari, R., Bishop, J. R., Bennett, B. L., Lawrence, R., Esko, J. D., ... Sinnis, P. (2007). Heparan sulfate proteoglycans provide a signal to Plasmodium sporozoites to stop migrating and productively invade host cells. *Cell Host & Microbe*, *2*(5), 316-327. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.10.002>
- Correa, R., Coronado, L. M., Garrido, A. C., Durant-Archibold, A. A., & Spadafora, C. (2017). Volatile organic compounds associated with Plasmodium falciparum infection in vitro. *Parasites & Vectors*, *10*(1), 215. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2157-x>
- Cosmi, L., Maggi, L., Santarlasci, V., Liotta, F., & Annunziato, F. (2014). T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *85*(1), 36-42. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22348>
- Costa, G., Loizon, S., Guenot, M., Mocan, I., Halary, F., de Saint-Basile, G., ... Behr, C. (2011). Control of Plasmodium falciparum erythrocytic cycle: γδ T cells target the red blood cell-invasive merozoites. *Blood*, *118*(26), 6952-6962. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-376111>

- Costello, R. T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.-J., Reviron, D., ... Moretta, A. (2002). Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 99(10), 3661-3667.
- Couper, K. N., Blount, D. G., Wilson, M. S., Hafalla, J. C., Belkaid, Y., Kamanaka, M., ... Riley, E. M. (2008). IL-10 from CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127⁻ adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS Pathogens*, 4(2), e1000004. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000004>
- Coura, J. R., Suárez-Mutis, M., & Ladeia-Andrade, S. (2006). A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic Plasmodium infection--a review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(3), 229-237.
- Courtin, D., Djilali-Saïah, A., Milet, J., Souldard, V., Gaye, O., Migot-Nabias, F., ... Luty, A. J. F. (2011). Schistosoma haematobium infection affects Plasmodium falciparum-specific IgG responses associated with protection against malaria. *Parasite Immunology*, 33(2), 124-131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01267.x>
- Courtin, D., Oesterholt, M., Huismans, H., Kusi, K., Milet, J., Badaut, C., ... Luty, A. J. F. (2009). The quantity and quality of African children's IgG responses to merozoite surface antigens reflect protection against Plasmodium falciparum malaria. *PloS One*, 4(10), e7590. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007590>
- Cox, F. E. G. (2002). History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 595-612. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.595-612.2002>
- Cox, F. E. G. (2004). History of human parasitic diseases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18(2), 171-188, table of contents. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.01.001>
- Cox-Singh, J., Davis, T. M. E., Lee, K.-S., Shamsul, S. S. G., Matusop, A., Ratnam, S., ... Singh, B. (2008). Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(2), 165-171. <https://doi.org/10.1086/524888>
- Cox-Singh, J., Hiu, J., Lucas, S. B., Divis, P. C., Zulkarnaen, M., Chandran, P., ... Krishna, S. (2010). Severe malaria - a case of fatal Plasmodium knowlesi infection with post-mortem findings: a case report. *Malaria Journal*, 9, 10. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-10>
- Crompton, P. D., Kayala, M. A., Traore, B., Kayentao, K., Ongoiba, A., Weiss, G. E., ... Pierce, S. K. (2010). A prospective analysis of the Ab response to Plasmodium falciparum before and after a malaria season by protein microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(15), 6958-6963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001323107>

- Crosnier, C., Bustamante, L. Y., Bartholdson, S. J., Bei, A. K., Theron, M., Uchikawa, M., ... Wright, G. J. (2011). Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature*, *480*(7378), 534-537. <https://doi.org/10.1038/nature10606>
- Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Annual Review of Immunology*, *29*(1), 621-663. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>
- Cucunubá, Z. M., Guerra, A. P., Rahirant, S. J., Rivera, J. A., Cortés, L. J., & Nicholls, R. S. (2008). Asymptomatic *Plasmodium* spp. infection in Tierralta, Colombia. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *103*(7), 668-673.
- Cunha, C. B., & Cunha, B. A. (2008). Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *Journal of Vector Borne Diseases*, *45*(3), 194-199.
- da Silva, H. B., de Salles, E. M., Panatieri, R. H., Boscardin, S. B., Rodríguez-Málaga, S. M., Alvarez, J. M., & D'Império Lima, M. R. (2013). IFN- γ -induced priming maintains long-term strain-transcending immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* malaria. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(10), 5160-5169. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300462>
- Dal-Bianco, M. P., Köster, K. B., Kombila, U. D., Kun, J. F. J., Grobusch, M. P., Ngoma, G. M., ... Kremsner, P. (2007). High prevalence of asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection in Gabonese adults. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *77*(5), 939-942.
- dalla Martha, R. C., Tada, M. S., Ferreira, R. G. de M., da Silva, L. H. P., & Wunderlich, G. (2007). Microsatellite characterization of *Plasmodium falciparum* from symptomatic and non-symptomatic infections from the Western Amazon reveals the existence of non-symptomatic infection-associated genotypes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *102*(3), 293-298.
- Das, S., Hertrich, N., Perrin, A. J., Withers-Martinez, C., Collins, C. R., Jones, M. L., ... Blackman, M. J. (2015). Processing of *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein MSP1 Activates a Spectrin-Binding Function Enabling Parasite Egress from RBCs. *Cell Host & Microbe*, *18*(4), 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.09.007>
- Daubersies, P., Sallenave-Sales, S., Magne, S., Trape, J. F., Contamin, H., Fandeur, T., ... Druilhe, P. (1996). Rapid turnover of *Plasmodium falciparum* populations in asymptomatic individuals living in a high transmission area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *54*(1), 18-26.
- Day, K. P., & Marsh, K. (1991). Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Immunology Today*, *12*(3), A68-71.

- de Andrade, A. L., Martelli, C. M., Oliveira, R. M., Arias, J. R., Zicker, F., & Pang, L. (1995). High prevalence of asymptomatic malaria in gold mining areas in Brazil. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 20(2), 475.
- De Maria, A., Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Puppo, F., Mavilio, D., ... Moretta, L. (2003). The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *European Journal of Immunology*, 33(9), 2410-2418. <https://doi.org/10.1002/eji.200324141>
- de Mast, Q., Brouwers, J., Syafruddin, D., Bousema, T., Baidjoe, A. Y., de Groot, P. G., ... Fijnheer, R. (2015). Is asymptomatic malaria really asymptomatic? Hematological, vascular and inflammatory effects of asymptomatic malaria parasitemia. *Journal of Infection*, 71(5), 587-596. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.08.005>
- de Mast, Q., Syafruddin, D., Keijmel, S., Riekerink, T. O., Deky, O., Asih, P. B., ... van der Ven, A. J. (2010). Increased serum hepcidin and alterations in blood iron parameters associated with asymptomatic *P. falciparum* and *P. vivax* malaria. *Haematologica*, 95(7), 1068-1074. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.019331>
- de Mendonça, V. R. R., Goncalves, M. S., & Barral-Netto, M. (2012). The host genetic diversity in malaria infection. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 940616. <https://doi.org/10.1155/2012/940616>
- De Moraes, C. M., Stanczyk, N. M., Betz, H. S., Pulido, H., Sim, D. G., Read, A. F., & Mescher, M. C. (2014). Malaria-induced changes in host odors enhance mosquito attraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(30), 11079-11084. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405617111>
- De Niz, M., Burda, P.-C., Kaiser, G., del Portillo, H. A., Spielmann, T., Frischknecht, F., & Heussler, V. T. (2017). Progress in imaging methods: insights gained into Plasmodium biology. *Nature Reviews Microbiology*, 15(1), 37-54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.158>
- De Souza, J. B., Williamson, K. H., Otani, T., & Playfair, J. H. (1997). Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infection and Immunity*, 65(5), 1593-1598.
- Delahaye, N. F., Barbier, M., Fumoux, F., & Rihet, P. (2007). Association analyses of NCR3 polymorphisms with *P. falciparum* mild malaria. *Microbes and Infection*, 9(2), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.11.002>
- Demarta-Gatsi, C., Peronet, R., Smith, L., Thiberge, S., Ménard, R., & Mécheri, S. (2017). Immunological memory to blood-stage malaria infection is controlled by the histamine releasing factor (HRF) of the parasite. *Scientific Reports*, 7(1), 9129. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09684-2>

- Dent, A. E., Nakajima, R., Liang, L., Baum, E., Moormann, A. M., Sumba, P. O., ... Kazura, J. W. (2015). Plasmodium falciparum Protein Microarray Antibody Profiles Correlate With Protection From Symptomatic Malaria in Kenya. *The Journal of Infectious Diseases*, 212(9), 1429-1438. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv224>
- Desowitz, R. S. (1991). The Malaria capers : more tales of parasites and people, research and reality. Consulté à l'adresse <http://www.who.int/iris/handle/10665/38058>
- Desowitz, R. S., Elm, J., & Alpers, M. P. (1993). Plasmodium falciparum-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgE antibodies in paired maternal-cord sera from east Sepik Province, Papua New Guinea. *Infection and Immunity*, 61(3), 988-993.
- deWalick, S., Amante, F. H., McSweeney, K. A., Randall, L. M., Stanley, A. C., Haque, A., ... Engwerda, C. R. (2007). Cutting edge: conventional dendritic cells are the critical APC required for the induction of experimental cerebral malaria. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(10), 6033-6037.
- Diakite, M., Clark, T. G., Auburn, S., Campino, S., Fry, A. E., Green, A., ... Rockett, K. A. (2009). A genetic association study in the Gambia using tagging polymorphisms in the major histocompatibility complex class III region implicates a HLA-B associated transcript 2 polymorphism in severe malaria susceptibility. *Human Genetics*, 125(1), 105-109. <https://doi.org/10.1007/s00439-008-0597-2>
- Diallo, T. O., Remoue, F., Gaayeb, L., Schacht, A.-M., Charrier, N., De Clerck, D., ... Riveau, G. (2010). Schistosomiasis coinfection in children influences acquired immune response against Plasmodium falciparum malaria antigens. *PLoS One*, 5(9), e12764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012764>
- Diaz, S. A., Martin, S. R., Howell, S. A., Grainger, M., Moon, R. W., Green, J. L., & Holder, A. A. (2016). The Binding of Plasmodium falciparum Adhesins and Erythrocyte Invasion Proteins to Aldolase Is Enhanced by Phosphorylation. *PLoS ONE*, 11(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161850>
- Dodoo, D., Omer, F. M., Todd, J., Akanmori, B. D., Koram, K. A., & Riley, E. M. (2002). Absolute levels and ratios of proinflammatory and anti-inflammatory cytokine production in vitro predict clinical immunity to Plasmodium falciparum malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(7), 971-979. <https://doi.org/10.1086/339408>
- D'Ombrian, M. C., Robinson, L. J., Stanistic, D. I., Taraika, J., Bernard, N., Michon, P., ... Schofield, L. (2008). Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 47(11), 1380-1387. <https://doi.org/10.1086/592971>

- D’Ombrain, M. C., Voss, T. S., Maier, A. G., Pearce, J. A., Hansen, D. S., Cowman, A. F., & Schofield, L. (2007). Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein-1 Specifically Suppresses Early Production of Host Interferon- γ . *Cell Host & Microbe*, 2(2), 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.012>
- Dondorp, A. M., Omodeo-Salè, F., Chotivanich, K., Taramelli, D., & White, N. J. (2003). Oxidative stress and rheology in severe malaria. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 8(5), 292-294. <https://doi.org/10.1179/135100003225002934>
- Dostert, C., Guarda, G., Romero, J. F., Menu, P., Gross, O., Tardivel, A., ... Tschopp, J. (2009). Malarial hemozoin is a Nalp3 inflammasome activating danger signal. *PLoS One*, 4(8), e6510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006510>
- Druilhe, P., Hagan, P., & Rook, G. A. W. (2002). The importance of models of infection in the study of disease resistance. *Trends in Microbiology*, 10(10 Suppl), S38-46.
- Druilhe, P., & Pérignon, J. L. (1994). Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans. *Immunology Letters*, 41(2-3), 115-120.
- Duarte, J., Deshpande, P., Guiyedi, V., Mécheri, S., Fesel, C., Cazenave, P.-A., ... Pied, S. (2007). Total and functional parasite specific IgE responses in Plasmodium falciparum-infected patients exhibiting different clinical status. *Malaria Journal*, 6, 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-1>
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nature Immunology*, 10(8), 857-863. <https://doi.org/10.1038/ni.1767>
- Duncan, C. J. A., Hill, A. V. S., & Ellis, R. D. (2012). Can growth inhibition assays (GIA) predict blood-stage malaria vaccine efficacy? *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(6), 706-714. <https://doi.org/10.4161/hv.19712>
- Dunst, J., Kamena, F., & Matuschewski, K. (2017). Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00324>
- Dunstan, S. J., Rockett, K. A., Quyen, N. T. N., Teo, Y. Y., Thai, C. Q., Hang, N. T., ... MalariaGEN Consortium. (2012). Variation in human genes encoding adhesion and proinflammatory molecules are associated with severe malaria in the Vietnamese. *Genes and Immunity*, 13(6), 503-508. <https://doi.org/10.1038/gene.2012.25>
- Dups, J. N., Pepper, M., & Cockburn, I. A. (2014). Antibody and B cell responses to Plasmodium sporozoites. *Frontiers in Microbiology*, 5, 625. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00625>

- Dutta, S., Sullivan, J. S., Grady, K. K., Haynes, J. D., Komisar, J., Batchelor, A. H., ... Barnwell, J. W. (2009). High antibody titer against apical membrane antigen-1 is required to protect against malaria in the Aotus model. *PLoS One*, 4(12), e8138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008138>
- Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, C. R., Hopp, C. S., ... Duraisingh, M. T. (2010). A plant-like kinase in *Plasmodium falciparum* regulates parasite egress from erythrocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5980), 910-912. <https://doi.org/10.1126/science.1188191>
- Earle, D. P. (1979). Presidential address: a history of malaria and its ironies. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 90, 1-26.
- Eischen, C. M., Schilling, J. D., Lynch, D. H., Krammer, P. H., & Leibson, P. J. (1996). Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(8), 2693-2699.
- Eke, R. A., & Chigbu, L. N. & N. (2006). High Prevalence of Asymptomatic *Plasmodium* Infection in a Suburb of Aba Town, Nigeria. *Annals of African Medicine*, 5(1), 42-45.
- Elliott, S. R., Spurck, T. P., Dodin, J. M., Maier, A. G., Voss, T. S., Yosaatmadja, F., ... Brown, G. V. (2007). Inhibition of Dendritic Cell Maturation by Malaria Is Dose Dependent and Does Not Require *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1. *Infection and Immunity*, 75(7), 3621-3632. <https://doi.org/10.1128/IAI.00095-07>
- Elloso, M. M., van der Heyde, H. C., vande Waa, J. A., Manning, D. D., & Weidanz, W. P. (1994). Inhibition of *Plasmodium falciparum* in vitro by human gamma delta T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 153(3), 1187-1194.
- Erdman, L. K., Cosio, G., Helmers, A. J., Gowda, D. C., Grinstein, S., & Kain, K. C. (2009). CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(10), 6452-6459. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901374>
- Falk, N., Kaestli, M., Qi, W., Ott, M., Baea, K., Cortés, A., & Beck, H.-P. (2009). Analysis of *Plasmodium falciparum* var genes expressed in children from Papua New Guinea. *The Journal of Infectious Diseases*, 200(3), 347-356. <https://doi.org/10.1086/600071>
- Farouk, S. E., Dolo, A., Bereczky, S., Kouriba, B., Maiga, B., Färnert, A., ... Troye-Blomberg, M. (2005). Different antibody- and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. *Microbes and Infection*, 7(1), 110-117. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.09.012>

- Farrington, L. A., Jagannathan, P., McIntyre, T. I., Vance, H. M., Bowen, K., Boyle, M. J., ... Feeney, M. E. (2016). Frequent Malaria Drives Progressive V δ 2 T-Cell Loss, Dysfunction, and CD16 Up-regulation During Early Childhood. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(9), 1483-1490. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv600>
- Fatih, F. A., Siner, A., Ahmed, A., Woon, L. C., Craig, A. G., Singh, B., ... Cox-Singh, J. (2012). Cytoadherence and virulence - the case of Plasmodium knowlesi malaria. *Malaria Journal*, 11, 33. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-33>
- Fauriat, C., Just-Landi, S., Mallet, F., Arnoulet, C., Sainty, D., Olive, D., & Costello, R. T. (2007). Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood*, 109(1), 323-330. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-027979>
- Fehniger, T. A., Shah, M. H., Turner, M. J., VanDeusen, J. B., Whitman, S. P., Cooper, M. A., ... Caligiuri, M. A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162(8), 4511-4520.
- Felgner, P. L., Roestenberg, M., Liang, L., Hung, C., Jain, A., Pablo, J., ... Sauerwein, R. (2013). Pre-erythrocytic antibody profiles induced by controlled human malaria infections in healthy volunteers under chloroquine prophylaxis. *Scientific Reports*, 3, 3549. <https://doi.org/10.1038/srep03549>
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., & Münz, C. (2002). Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 195(3), 343-351. <https://doi.org/10.1084/jem.20011149>
- Fernandez-Reyes, D., Craig, A. G., Kyes, S. A., Peshu, N., Snow, R. W., Berendt, A. R., ... Newbold, C. I. (1997). A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Human Molecular Genetics*, 6(8), 1357-1360.
- Ferrante, A., Kumaratilake, L., Rzepczyk, C. M., & Dayer, J. M. (1990). Killing of Plasmodium falciparum by cytokine activated effector cells (neutrophils and macrophages). *Immunology Letters*, 25(1-3), 179-187.
- Flori, L., Delahaye, N. F., Iraqi, F. A., Hernandez-Valladares, M., Fumoux, F., & Rihet, P. (2005). TNF as a malaria candidate gene: polymorphism-screening and family-based association analysis of mild malaria attack and parasitemia in Burkina Faso. *Genes and Immunity*, 6(6), 472-480. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364231>

- Flori, L., Kumulungui, B., Aucan, C., Esnault, C., Traoré, A. S., Fumoux, F., & Rihet, P. (2003). Linkage and association between *Plasmodium falciparum* blood infection levels and chromosome 5q31-q33. *Genes and Immunity*, 4(4), 265-268. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363960>
- Flori, L., Sawadogo, S., Esnault, C., Delahaye, N. F., Fumoux, F., & Rihet, P. (2003). Linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in families living in Burkina Faso. *Human Molecular Genetics*, 12(4), 375-378.
- Fong, C. L., Siddiqui, A. H., & Mark, D. F. (1994). Identification and characterization of a novel repressor site in the human tumor necrosis factor alpha gene. *Nucleic Acids Research*, 22(6), 1108-1114.
- Francis, S. E., Sullivan, D. J., & Goldberg, D. E. (1997). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology*, 51, 97-123. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.97>
- Franklin, B. S., Rodrigues, S. O., Antonelli, L. R., Oliveira, R. V., Goncalves, A. M., Sales-Junior, P. A., ... Gazzinelli, R. T. (2007). MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes and Infection*, 9(7), 881-890. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.03.007>
- Freitas do Rosário, A. P., Lamb, T., Spence, P., Stephens, R., Lang, A., Roers, A., ... Langhorne, J. (2012). IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(3), 1178-1190. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102755>
- French, N., Nakiyingi, J., Lugada, E., Watera, C., Whitworth, J. A., & Gilks, C. F. (2001). Increasing rates of malarial fever with deteriorating immune status in HIV-1-infected Ugandan adults. *AIDS (London, England)*, 15(7), 899-906.
- Frevert, U., Nacer, A., Cabrera, M., Movila, A., & Leberl, M. (2014). Imaging *Plasmodium* immunobiology in the liver, brain, and lung. *Parasitology International*, 63(1), 171-186. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.013>
- Fritsche, G., Larcher, C., Schennach, H., & Weiss, G. (2001). Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against *Plasmodium falciparum* infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(9), 1388-1394. <https://doi.org/10.1086/319860>
- Fry, A. E., Auburn, S., Diakite, M., Green, A., Richardson, A., Wilson, J., ... Kwiatkowski, D. P. (2008). Variation in the ICAM1 gene is not associated with severe malaria phenotypes. *Genes and Immunity*, 9(5), 462-469. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.38>

- Fugikaha, E., Fornazari, P. A., Penhalbel, R. de S. R., Lorenzetti, A., Maroso, R. D., Amoras, J. T., ... Machado, R. L. D. (2007). Molecular screening of Plasmodium sp. asymptomatic carriers among transfusion centers from Brazilian Amazon region. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 49(1), 1-4.
- Gamo, F.-J., Sanz, L. M., Vidal, J., de Cozar, C., Alvarez, E., Lavandera, J.-L., ... Garcia-Bustos, J. F. (2010). Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*, 465(7296), 305-310. <https://doi.org/10.1038/nature09107>
- Gantz, V. M., Jasinskiene, N., Tatarenkova, O., Fazekas, A., Macias, V. M., Bier, E., & James, A. A. (2015). Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(49), E6736-6743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521077112>
- Garcia, A., Cot, M., Chippaux, J. P., Ranque, S., Feingold, J., Demenais, F., & Abel, L. (1998). Genetic control of blood infection levels in human malaria: evidence for a complex genetic model. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(4), 480-488.
- Garcia, A., Marquet, S., Bucheton, B., Hillaire, D., Cot, M., Fievet, N., ... Abel, L. (1998). Linkage analysis of blood Plasmodium falciparum levels: interest of the 5q31-q33 chromosome region. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(6), 705-709.
- Gatton, M. L., & Cheng, Q. (2002). Evaluation of the pyrogenic threshold for Plasmodium falciparum malaria in naive individuals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(5), 467-473.
- Gatton, M. L., & Cheng, Q. (2004). Investigating antigenic variation and other parasite-host interactions in Plasmodium falciparum infections in naïve hosts. *Parasitology*, 128(Pt 4), 367-376.
- Gazzinelli, R. T., Kalantari, P., Fitzgerald, K. A., & Golenbock, D. T. (2014). Innate sensing of malaria parasites. *Nature Reviews. Immunology*, 14(11), 744-757. <https://doi.org/10.1038/nri3742>
- Gething, P. W., Casey, D. C., Weiss, D. J., Bisanzio, D., Bhatt, S., Cameron, E., ... Lim, S. S. (2016). Mapping Plasmodium falciparum Mortality in Africa between 1990 and 2015. *The New England journal of medicine*, 375(25), 2435-2445. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606701>
- Gichohi-Wainaina, W. N., Melse-Boonstra, A., Feskens, E. J., Demir, A. Y., Veenemans, J., & Verhoef, H. (2015). Tumour necrosis factor allele variants and their association with the occurrence and severity of malaria in African children: a longitudinal study. *Malaria Journal*, 14, 249. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0767-3>

- Giglioli, G. (1963). Ecological change as a factor in renewed malaria transmission in an eradicated area. A localized outbreak of *A. aquasalis* transmitted malaria on the Demerara River Estuary, British Guiana, in the fifteenth year of *A. darlingi* and malaria eradication. *Bulletin of the World Health Organization*, 29, 131-145.
- Gilles, H. M., Fletcher, K. A., Hendrickse, R. G., Lindner, R., Reddy, S., & Allan, N. (1967). Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency, sickling, and malaria in African children in South Western Nigeria. *Lancet (London, England)*, 1(7482), 138-140.
- Giusti, P., Urban, B. C., Frascaroli, G., Albrecht, L., Tinti, A., Troye-Blomberg, M., & Varani, S. (2011). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and beta-hematin induce partial maturation of human dendritic cells and increase their migratory ability in response to lymphoid chemokines. *Infection and Immunity*, 79(7), 2727-2736. <https://doi.org/10.1128/IAI.00649-10>
- Golden-Mason, L., Cox, A. L., Randall, J. A., Cheng, L., & Rosen, H. R. (2010). Increased natural killer cell cytotoxicity and NKp30 expression protects against hepatitis C virus infection in high-risk individuals and inhibits replication in vitro. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(5), 1581-1589. <https://doi.org/10.1002/hep.23896>
- Gonçalves, R. M., Salmazi, K. C., Santos, B. A. N., Bastos, M. S., Rocha, S. C., Boscardin, S. B., ... Scopel, K. K. G. (2010). CD4+ CD25+ Foxp3+ Regulatory T Cells, Dendritic Cells, and Circulating Cytokines in Uncomplicated Malaria: Do Different Parasite Species Elicit Similar Host Responses? *Infection and Immunity*, 78(11), 4763-4772. <https://doi.org/10.1128/IAI.00578-10>
- González, R., Ataíde, R., Naniiche, D., Menéndez, C., & Mayor, A. (2012). HIV and malaria interactions: where do we stand? *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(2), 153-165. <https://doi.org/10.1586/eri.11.167>
- Gonzalez-Aseguinolaza, G., Oliveira, C. de, Tomaska, M., Hong, S., Bruna-Romero, O., Nakayama, T., ... Tsuji, M. (2000). α -Galactosylceramide-activated V α 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(15), 8461-8466. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8461>
- Good, M. F., & Doolan, D. L. (1999). Immune effector mechanisms in malaria. *Current Opinion in Immunology*, 11(4), 412-419. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)80069-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)80069-7)
- Good, M. F., & Doolan, D. L. (2007). Malaria's journey through the lymph node. *Nature Medicine*, 13(9), 1023-1024. <https://doi.org/10.1038/nm0907-1015>
- Goodier, M. R., Lundqvist, C., Hammarström, M. L., Troye-Blomberg, M., & Langhorne, J. (1995). Cytokine profiles for human V gamma 9+ T cells stimulated by Plasmodium falciparum. *Parasite Immunology*, 17(8), 413-423.

- Gramzinski, R. A., Doolan, D. L., Sedegah, M., Davis, H. L., Krieg, A. M., & Hoffman, S. L. (2001). Interleukin-12- and gamma interferon-dependent protection against malaria conferred by CpG oligodeoxynucleotide in mice. *Infection and Immunity*, *69*(3), 1643-1649. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1643-1649.2001>
- Grau, G. E., Heremans, H., Piguet, P. F., Pointaire, P., Lambert, P. H., Billiau, A., & Vassalli, P. (1989). Monoclonal antibody against interferon gamma can prevent experimental cerebral malaria and its associated overproduction of tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(14), 5572-5574.
- Grau, G. E. R., & Craig, A. G. (2012). Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiology*, *7*(2), 291-302. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.155>
- Gray, J. C., Corran, P. H., Mangia, E., Gaunt, M. W., Li, Q., Tetteh, K. K. A., ... Crisanti, A. (2007). Profiling the antibody immune response against blood stage malaria vaccine candidates. *Clinical Chemistry*, *53*(7), 1244-1253. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2006.081695>
- Greenwood, B., & Doumbo, O. K. (2016). Implementation of the malaria candidate vaccine RTS,S/AS01. *The Lancet*, *387*(10016), 318-319. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00807-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00807-7)
- Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., & Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunological Reviews*, *220*, 169-182. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00563.x>
- Griffin, J. T., Hollingsworth, T. D., Reyburn, H., Drakeley, C. J., Riley, E. M., & Ghani, A. C. (2015). Gradual acquisition of immunity to severe malaria with increasing exposure. *Proceedings. Biological Sciences*, *282*(1801), 20142657. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.2657>
- Grobusch, M. P., & Kremsner, P. G. (2005). Uncomplicated malaria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *295*, 83-104.
- Gun, S. Y., Claser, C., Tan, K. S. W., & Rénia, L. (2014). Interferons and interferon regulatory factors in malaria. *Mediators of Inflammation*, *2014*, 243713. <https://doi.org/10.1155/2014/243713>
- Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., ... Nolan, T. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, *34*(1), 78-83. <https://doi.org/10.1038/nbt.3439>
- Hananantachai, H., Patarapotikul, J., Ohashi, J., Naka, I., Krudsood, S., Looareesuwan, S., & Tokunaga, K. (2007). Significant association between TNF-alpha (TNF) promoter allele (-1031C, -863C, and -857C) and cerebral malaria in Thailand. *Tissue Antigens*, *69*(3), 277-280. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.00756.x>

- Hananantachai, H., Patarapotikul, J., Ohashi, J., Naka, I., Looareesuwan, S., & Tokunaga, K. (2005). Polymorphisms of the HLA-B and HLA-DRB1 genes in Thai malaria patients. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58(1), 25-28.
- Hansen, D. S., Bernard, N. J., Nie, C. Q., & Schofield, L. (2007). NK cells stimulate recruitment of CXCR3+ T cells to the brain during Plasmodium berghei-mediated cerebral malaria. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(9), 5779-5788.
- Hansen, D. S., Ryg-Cornejo, V., Ioannidis, L. J., Chiu, C. Y., Ly, A., Nie, C. Q., ... Schofield, L. (2014). The contribution of natural killer complex loci to the development of experimental cerebral malaria. *PloS One*, 9(4), e93268. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093268>
- Hansen, D. S., Siomos, M.-A., De Koning-Ward, T., Buckingham, L., Crabb, B. S., & Schofield, L. (2003). CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. *European Journal of Immunology*, 33(9), 2588-2598. <https://doi.org/10.1002/eji.200323666>
- Haque, A., Best, S. E., Unosson, K., Amante, F. H., de Labastida, F., Anstey, N. M., ... Engwerda, C. R. (2011). Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(11), 6148-6156. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003955>
- Harinasuta, T., Suntharasamai, P., & Viravan, C. (1965). Chloroquine-resistant falciparum malaria in Thailand. *The Lancet*, 286(7414), 657-660. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(65\)90395-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(65)90395-8)
- Harris, I., Sharrock, W. W., Bain, L. M., Gray, K.-A., Bobogare, A., Boaz, L., ... Cheng, Q. (2010). A large proportion of asymptomatic Plasmodium infections with low and sub-microscopic parasite densities in the low transmission setting of Temotu Province, Solomon Islands: challenges for malaria diagnostics in an elimination setting. *Malaria Journal*, 9, 254. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-254>
- Härtel, C., Adam, N., Strunk, T., Temming, P., Müller-Steinhardt, M., & Schultz, C. (2005). Cytokine responses correlate differentially with age in infancy and early childhood. *Clinical and Experimental Immunology*, 142(3), 446-453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02928.x>
- Hawass, Z., Gad, Y. Z., Ismail, S., Khairat, R., Fathalla, D., Hasan, N., ... Pusch, C. M. (2010). Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *JAMA*, 303(7), 638-647. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.121>
- Hawking, F. (1954). Milk, p-aminobenzoate, and malaria of rats and monkeys. *British Medical Journal*, 1(4859), 425-429.

- Heintzelman, M. B. (2015). Gliding motility in apicomplexan parasites. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 46, 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.020>
- Hermesen, C. C., Konijnenberg, Y., Mulder, L., Loé, C., van Deuren, M., van der Meer, J. W. M., ... Sauerwein, R. W. (2003). Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clinical and Experimental Immunology*, 132(3), 467-472.
- Hernandez-Valladares, M., Rihet, P., ole-MoiYoi, O. K., & Iraqi, F. A. (2004). Mapping of a new quantitative trait locus for resistance to malaria in mice by a comparative mapping approach with human Chromosome 5q31-q33. *Immunogenetics*, 56(2), 115-117. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0667-0>
- Hill, A. V., Allsopp, C. E., Kwiatkowski, D., Anstey, N. M., Twumasi, P., Rowe, P. A., ... Greenwood, B. M. (1991). Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, 352(6336), 595-600. <https://doi.org/10.1038/352595a0>
- Hill, D. L., Eriksson, E. M., Li Wai Suen, C. S. N., Chiu, C. Y., Ryg-Cornejo, V., Robinson, L. J., ... Schofield, L. (2013). Opsonising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated with immunity to clinical malaria. *PLoS One*, 8(9), e74627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074627>
- Hirayasu, K., Ohashi, J., Kashiwase, K., Hananantachai, H., Naka, I., Ogawa, A., ... Yabe, T. (2012). Significant association of KIR2DL3-HLA-C1 combination with cerebral malaria and implications for co-evolution of KIR and HLA. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002565. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002565>
- Hoffman, S. L., Oster, C. N., Plowe, C. V., Woollett, G. R., Beier, J. C., Chulay, J. D., ... Mugambi, M. (1987). Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4815), 639-642.
- Höglund, P., & Brodin, P. (2010). Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nature Reviews. Immunology*, 10(10), 724-734. <https://doi.org/10.1038/nri2835>
- Horowitz, A., Behrens, R. H., Okell, L., Fooks, A. R., & Riley, E. M. (2010). NK Cells as Effectors of Acquired Immune Responses: Effector CD4+ T Cell-Dependent Activation of NK Cells Following Vaccination. *The Journal of Immunology*, 185(5), 2808-2818. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000844>
- Horowitz, A., Strauss-Albee, D. M., Leipold, M., Kubo, J., Nemat-Gorgani, N., Dogan, O. C., ... Blish, C. A. (2013). Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Science Translational Medicine*, 5(208), 208ra145. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006702>

- Howard, J., Loizon, S., Tyler, C. J., Duluc, D., Moser, B., Mechain, M., ... Mamani-Matsuda, M. (2017). The Antigen-Presenting Potential of V γ 9V δ 2 T Cells During Plasmodium falciparum Blood-Stage Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(10), 1569-1579. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix149>
- Howes, R. E., Reiner, R. C., Battle, K. E., Longbottom, J., Mappin, B., Ordanovich, D., ... Hay, S. I. (2015). Plasmodium vivax Transmission in Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11), e0004222. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004222>
- Howland, S. W., Poh, C. M., Gun, S. Y., Claser, C., Malleret, B., Shastri, N., ... Rénia, L. (2013). Brain microvessel cross-presentation is a hallmark of experimental cerebral malaria. *EMBO Molecular Medicine*, 5(7), 984-999. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202273>
- Howland, S. W., Poh, C. M., & Rénia, L. (2015). Activated Brain Endothelial Cells Cross-Present Malaria Antigen. *PLoS Pathogens*, 11(6), e1004963. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004963>
- Huang, K.-Y., Schultz, W. W., & Gordon, F. B. (1968). Interferon Induced by Plasmodium berghei. *Science*, 162(3849), 123-124. <https://doi.org/10.1126/science.162.3849.123>
- Huggins, M. A., Johnson, H. L., Jin, F., N'Songo, A., Hanson, L. M., LaFrance, S. J., ... Johnson, A. J. (2017). Perforin Expression by CD8 T Cells Is Sufficient To Cause Fatal Brain Edema during Experimental Cerebral Malaria. *Infection and Immunity*, 85(5), e00985-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00985-16>
- Hunter, S., Indik, Z. K., Kim, M. K., Cauley, M. D., Park, J. G., & Schreiber, A. D. (1998). Inhibition of Fc γ receptor-mediated phagocytosis by a nonphagocytic Fc γ receptor. *Blood*, 91(5), 1762-1768.
- Hviid, L., Marinho, C. R. F., Staalsoe, T., & Penha-Gonçalves, C. (2010). Of mice and women: rodent models of placental malaria. *Trends in Parasitology*, 26(8), 412-419. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.010>
- Imai, T., Ishida, H., Suzue, K., Taniguchi, T., Okada, H., Shimokawa, C., & Hisaeda, H. (2015). Cytotoxic activities of CD8⁺ T cells collaborate with macrophages to protect against blood-stage murine malaria. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.04232>
- Imwong, M., Nguyen, T. N., Tripura, R., Peto, T. J., Lee, S. J., Lwin, K. M., ... Nosten, F. (2015). The epidemiology of subclinical malaria infections in South-East Asia: findings from cross-sectional surveys in Thailand-Myanmar border areas, Cambodia, and Vietnam. *Malaria Journal*, 14, 381. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0906-x>
- Ing, R., Gros, P., & Stevenson, M. M. (2005). Interleukin-15 enhances innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection in mice. *Infection and Immunity*, 73(5), 3172-3177. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.3172-3177.2005>

- Ing, R., Segura, M., Thawani, N., Tam, M., & Stevenson, M. M. (2006). Interaction of mouse dendritic cells and malaria-infected erythrocytes: uptake, maturation, and antigen presentation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *176*(1), 441-450.
- Ing, R., & Stevenson, M. M. (2009). Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in mice. *Infection and Immunity*, *77*(2), 770-782. <https://doi.org/10.1128/IAI.00994-08>
- Inoue, S.-I., Niikura, M., Mineo, S., & Kobayashi, F. (2013). Roles of IFN- γ and $\gamma\delta$ T Cells in Protective Immunity Against Blood-Stage Malaria. *Frontiers in Immunology*, *4*, 258. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00258>
- Ishida, H., Matsuzaki-Moriya, C., Imai, T., Yanagisawa, K., Nojima, Y., Suzue, K., ... Hisaeda, H. (2010). Development of experimental cerebral malaria is independent of IL-23 and IL-17. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *402*(4), 790-795. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.114>
- Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y., & Yuda, M. (2004). Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biology*, *2*(1), E4. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020004>
- Ishizuka, A. S., Lyke, K. E., DeZure, A., Berry, A. A., Richie, T. L., Mendoza, F. H., ... Seder, R. A. (2016). Protection against malaria at 1 year and immune correlates following PfSPZ vaccination. *Nature Medicine*, *22*(6), 614-623. <https://doi.org/10.1038/nm.4110>
- Ivarsson, M. A., Michaëlsson, J., & Fauriat, C. (2014). Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Frontiers in Immunology*, *5*, 184. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00184>
- Jafarshad, A., Dziegiel, M. H., Lundquist, R., Nielsen, L. K., Singh, S., & Druilhe, P. L. (2007). A novel antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism involved in defense against malaria requires costimulation of monocytes Fc γ RII and Fc γ RIII. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *178*(5), 3099-3106.
- Jagannathan, P., Eccles-James, I., Bowen, K., Nankya, F., Auma, A., Wamala, S., ... Feeney, M. E. (2014). IFN γ /IL-10 co-producing cells dominate the CD4 response to malaria in highly exposed children. *PLoS Pathogens*, *10*(1), e1003864. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003864>
- Jagannathan, P., Lutwama, F., Boyle, M. J., Nankya, F., Farrington, L. A., McIntyre, T. I., ... Feeney, M. E. (2017). V δ 2+ T cell response to malaria correlates with protection from infection but is attenuated with repeated exposure. *Scientific Reports*, *7*(1), 11487. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10624-3>

- Jakeman, G. N., Saul, A., Hogarth, W. L., & Collins, W. E. (1999). Anaemia of acute malaria infections in non-immune patients primarily results from destruction of uninfected erythrocytes. *Parasitology*, *119* (Pt 2), 127-133.
- Jallow, M., Teo, Y. Y., Small, K. S., Rockett, K. A., Deloukas, P., Clark, T. G., ... Malaria Genomic Epidemiology Network. (2009). Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. *Nature Genetics*, *41*(6), 657-665. <https://doi.org/10.1038/ng.388>
- Jangpatarapongsa, K., Chootong, P., Sattabongkot, J., Chotivanich, K., Sirichaisinthop, J., Tungpradabkul, S., ... Udomsangpetch, R. (2008). Plasmodium vivax parasites alter the balance of myeloid and plasmacytoid dendritic cells and the induction of regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, *38*(10), 2697-2705. <https://doi.org/10.1002/eji.200838186>
- Janse, C. J., Ponnudurai, T., Lensen, A. H., Meuwissen, J. H., Ramesar, J., Van der Ploeg, M., & Overdulve, J. P. (1988). DNA synthesis in gametocytes of Plasmodium falciparum. *Parasitology*, *96* (Pt 1), 1-7.
- Jepson, A. P., Banya, W. A., Sisay-Joof, F., Hassan-King, M., Bennett, S., & Whittle, H. C. (1995). Genetic regulation of fever in Plasmodium falciparum malaria in Gambian twin children. *The Journal of Infectious Diseases*, *172*(1), 316-319.
- Jepson, A., Sisay-Joof, F., Banya, W., Hassan-King, M., Frodsham, A., Bennett, S., ... Whittle, H. (1997). Genetic linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in Gambian children: study of affected sibling pairs. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *315*(7100), 96-97.
- Joice, R., Nilsson, S. K., Montgomery, J., Dankwa, S., Egan, E., Morahan, B., ... Marti, M. (2014). Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Science Translational Medicine*, *6*(244), 244re5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008882>
- Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T., & Kanbara, H. (2004). Naturally acquired Plasmodium knowlesi malaria in human, Thailand. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(12), 2211-2213. <https://doi.org/10.3201/eid1012.040293>
- Josling, G. A., & Llinás, M. (2015). Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(9), 573-587. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3519>
- Jr, C. A. J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J., Jr, C. A. J., Travers, P., ... Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology* (5th éd.). Garland Science.
- Jr, S. R. T. (2008). *Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text*. Boca Raton: CRC Press.

- Kadekoppala, M., & Holder, A. A. (2010). Merozoite surface proteins of the malaria parasite: the MSP1 complex and the MSP7 family. *International Journal for Parasitology*, *40*(10), 1155-1161.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.04.008>
- Kafsack, B. F. C., Rovira-Graells, N., Clark, T. G., Bancells, C., Crowley, V. M., Campino, S. G., ... Llinás, M. (2014). A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature*, *507*(7491), 248-252. <https://doi.org/10.1038/nature12920>
- Kägi, D., Vignaux, F., Ledermann, B., Bürki, K., Depraetere, V., Nagata, S., ... Golstein, P. (1994). Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science (New York, N.Y.)*, *265*(5171), 528-530.
- Kaijzel, E. L., Bayley, J. P., van Krugten, M. V., Smith, L., van de Linde, P., Bakker, A. M., ... Verweij, C. L. (2001). Allele-specific quantification of tumor necrosis factor alpha (TNF) transcription and the role of promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis patients and healthy individuals. *Genes and Immunity*, *2*(3), 135-144.
<https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363747>
- Kaluza, W., Reuss, E., Grossmann, S., Hug, R., Schopf, R. E., Galle, P. R., ... Hoehler, T. (2000). Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *The Journal of Investigative Dermatology*, *114*(6), 1180-1183.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00001.x>
- Karimi, M., Goldie, L. C., Cruickshank, M. N., Moses, E. K., & Abraham, L. J. (2009). A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of -308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, *17*(11), 1454-1462. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.80>
- Kariu, T., Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y., & Yuda, M. (2006). CelTOS, a novel malarial protein that mediates transmission to mosquito and vertebrate hosts. *Molecular Microbiology*, *59*(5), 1369-1379.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05024.x>
- Kassim, O. O., Ako-Anai, K. A., Torimiro, S. E., Hollowell, G. P., Okoye, V. C., & Martin, S. K. (2000). Inhibitory factors in breastmilk, maternal and infant sera against in vitro growth of Plasmodium falciparum malaria parasite. *Journal of Tropical Pediatrics*, *46*(2), 92-96.
- Kaushansky, A., Douglass, A. N., Arang, N., Vigdorovich, V., Dambrauskas, N., Kain, H. S., ... Kappe, S. H. I. (2015). Malaria parasites target the hepatocyte receptor EphA2 for successful host infection. *Science (New York, N.Y.)*, *350*(6264), 1089-1092. <https://doi.org/10.1126/science.aad3318>

- Keen, J., Serghides, L., Ayi, K., Patel, S. N., Ayisi, J., van Eijk, A., ... Kain, K. C. (2007). HIV impairs opsonic phagocytic clearance of pregnancy-associated malaria parasites. *PLoS Medicine*, 4(5), e181.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040181>
- Keiser, J., De Castro, M. C., Maltese, M. F., Bos, R., Tanner, M., Singer, B. H., & Utzinger, J. (2005). Effect of irrigation and large dams on the burden of malaria on a global and regional scale. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(4), 392-406.
- Kelly, M., Su, C.-Y., Schaber, C., Crowley, J. R., Hsu, F.-F., Carlson, J. R., & Odom, A. R. (2015). Malaria parasites produce volatile mosquito attractants. *MBio*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00235-15>
- Kelly-Hope, L., Ranson, H., & Hemingway, J. (2008). Lessons from the past: managing insecticide resistance in malaria control and eradication programmes. *The Lancet. Infectious Diseases*, 8(6), 387-389.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70045-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70045-8)
- Keswani, T., & Bhattacharyya, A. (2014). Differential role of T regulatory and Th17 in Swiss mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA and *Plasmodium yoelii*. *Experimental Parasitology*, 141, 82-92.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.03.003>
- Kho, S., Marfurt, J., Noviyanti, R., Kusuma, A., Piera, K. A., Burdam, F. H., ... Woodberry, T. (2015). Preserved Dendritic Cell HLA-DR Expression and Reduced Regulatory T Cell Activation in Asymptomatic *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* Infection. *Infection and Immunity*, 83(8), 3224-3232.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00226-15>
- Khor, C. C., Vannberg, F. O., Chapman, S. J., Walley, A., Aucan, C., Loke, H., ... Hill, A. V. S. (2007). Positive replication and linkage disequilibrium mapping of the chromosome 21q22.1 malaria susceptibility locus. *Genes and Immunity*, 8(7), 570-576. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364417>
- Khusmith, S., & Druilhe, P. (1983). Cooperation between antibodies and monocytes that inhibit in vitro proliferation of *Plasmodium falciparum*. *Infection and Immunity*, 41(1), 219-223.
- Kicska, G. A., Ting, L.-M., Schramm, V. L., & Kim, K. (2003). Effect of dietary p-aminobenzoic acid on murine *Plasmodium yoelii* infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(11), 1776-1781.
<https://doi.org/10.1086/379373>
- Kilejian, A. (1979). Characterization of a protein correlated with the production of knob-like protrusions on membranes of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4650-4653.

- Kimura, A., & Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, *40*(7), 1830-1835. <https://doi.org/10.1002/eji.201040391>
- King, T., & Lamb, T. (2015). Interferon- γ : The Jekyll and Hyde of Malaria. *PLOS Pathogens*, *11*(10), e1005118. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005118>
- Kiss-Toth, E., Harlock, E., Lath, D., Quertermous, T., & Wilkinson, J. M. (2013). A TNF variant that associates with susceptibility to musculoskeletal disease modulates thyroid hormone receptor binding to control promoter activation. *PLoS One*, *8*(9), e76034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076034>
- Knight, J. C. (2005). Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *Journal of Molecular Medicine*, *83*(2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0603-7>
- Knight, J. C., Keating, B. J., Rockett, K. A., & Kwiatkowski, D. P. (2003). In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. *Nature Genetics*, *33*(4), 469-475. <https://doi.org/10.1038/ng1124>
- Knight, J. C., & Kwiatkowski, D. (1999). Inherited Variability of Tumor Necrosis Factor Production and Susceptibility to Infectious Disease. *Proceedings of the Association of American Physicians*, *111*(4), 290-298. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1381.1999.99237.x>
- Knight, J. C., Udalova, I., Hill, A. V., Greenwood, B. M., Peshu, N., Marsh, K., & Kwiatkowski, D. (1999). A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nature Genetics*, *22*(2), 145-150. <https://doi.org/10.1038/9649>
- Koch, M., & Baum, J. (2016). The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. *Cellular Microbiology*, *18*(3), 319-329. <https://doi.org/10.1111/cmi.12557>
- Koch, O., Rockett, K., Jallow, M., Pinder, M., Sisay-Joof, F., & Kwiatkowski, D. (2005). Investigation of malaria susceptibility determinants in the IFNG/IL26/IL22 genomic region. *Genes and Immunity*, *6*(4), 312-318. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364214>
- Koella, J. C., Sørensen, F. L., & Anderson, R. A. (1998). The malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, increases the frequency of multiple feeding of its mosquito vector, *Anopheles gambiae*. *Proceedings. Biological Sciences*, *265*(1398), 763-768. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0358>
- Korbel, D. S., Newman, K. C., Almeida, C. R., Davis, D. M., & Riley, E. M. (2005). Heterogeneous human NK cell responses to *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *175*(11), 7466-7473.

- Korbel, D. S., Norman, P. J., Newman, K. C., Horowitz, A., Gendzekhadze, K., Parham, P., & Riley, E. M. (2009). Killer Ig-like receptor (KIR) genotype predicts the capacity of human KIR-positive CD56dim NK cells to respond to pathogen-associated signals. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *182*(10), 6426-6434. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804224>
- Koukouikila-Koussounda, F., & Ntoumi, F. (2016). Malaria epidemiological research in the Republic of Congo. *Malaria Journal*, *15*(1), 598. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1617-7>
- Krafts, K., Hempelmann, E., & Skórska-Stania, A. (2012). From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy. *Parasitology Research*, *111*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2886-x>
- Kroeger, K. M., Carville, K. S., & Abraham, L. J. (1997). The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Molecular Immunology*, *34*(5), 391-399.
- Kumar, S., Gowda, N. M., Wu, X., Gowda, R. N., & Gowda, D. C. (2012). CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells. *Parasite Immunology*, *34*(7), 372-382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01367.x>
- Kumsiri, R., Troye-Blomberg, M., Pattanapanyasat, K., Krudsood, S., & Maneerat, Y. (2016). IgE low affinity receptor (CD23) expression, Plasmodium falciparum specific IgE and tumor necrosis factor-alpha production in Thai uncomplicated and severe falciparum malaria patients. *Acta Tropica*, *154*, 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.017>
- Kun, J. F., Klabunde, J., Lell, B., Luckner, D., Alpers, M., May, J., ... Kremsner, P. G. (1999). Association of the ICAM-1Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambaréné, Gabon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *61*(5), 776-779.
- Kwiatkowski, D. P. (2005). How Malaria Has Affected the Human Genome and What Human Genetics Can Teach Us about Malaria. *American Journal of Human Genetics*, *77*(2), 171-192.
- Lacroix, R., Mukabana, W. R., Gouagna, L. C., & Koella, J. C. (2005). Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biology*, *3*(9), e298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030298>
- Lai, C. B., & Mager, D. L. (2012). Role of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) in transcription regulation of natural cytotoxicity receptor 1 (NCR1/NKp46), an activating natural killer (NK) cell receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(10), 7324-7334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.306936>

- Laishram, D. D., Sutton, P. L., Nanda, N., Sharma, V. L., Sobti, R. C., Carlton, J. M., & Joshi, H. (2012). The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria Journal*, *11*, 29. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-29>
- Lalremruata, A., Ball, M., Bianucci, R., Welte, B., Nerlich, A. G., Kun, J. F. J., & Pusch, C. M. (2013). Molecular identification of falciparum malaria and human tuberculosis co-infections in mummies from the Fayum depression (Lower Egypt). *PLoS One*, *8*(4), e60307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060307>
- Langhorne, J., Gillard, S., Simon, B., Slade, S., & Eichmann, K. (1989a). Frequencies of CD4+ T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. *International Immunology*, *1*(4), 416-424.
- Langhorne, J., Gillard, S., Simon, B., Slade, S., & Eichmann, K. (1989b). Frequencies of CD4+ T cells reactive with *Plasmodium chabaudi chabaudi*: distinct response kinetics for cells with Th1 and Th2 characteristics during infection. *International Immunology*, *1*(4), 416-424.
- Langhorne, J., Ndungu, F. M., Sponaas, A.-M., & Marsh, K. (2008). Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology*, *9*(7), 725-732. <https://doi.org/10.1038/ni.f.205>
- Lau, L. S., Fernandez Ruiz, D., Davey, G. M., de Koning-Ward, T. F., Papenfuss, A. T., Carbone, F. R., ... Heath, W. R. (2011). Blood-stage *Plasmodium berghei* infection generates a potent, specific CD8+ T-cell response despite residence largely in cells lacking MHC I processing machinery. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(12), 1989-1996. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir656>
- Lau, L. S., Fernandez-Ruiz, D., Mollard, V., Sturm, A., Neller, M. A., Cozijnsen, A., ... Heath, W. R. (2014). CD8+ T cells from a novel T cell receptor transgenic mouse induce liver-stage immunity that can be boosted by blood-stage infection in rodent malaria. *PLoS Pathogens*, *10*(5), e1004135. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004135>
- Lavstsen, T., Salanti, A., Jensen, A. T., Arnot, D. E., & Theander, T. G. (2003). Sub-grouping of *Plasmodium falciparum* 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. *Malaria Journal*, *2*, 27. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-2-27>
- Layez, C., Nogueira, P., Combes, V., Costa, F. T. M., Juhan-Vague, I., Silva, L. H. P. da, & Gysin, J. (2005). *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood*, *106*(10), 3632-3638. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1574>

- Lennartz, F., Adams, Y., Bengtsson, A., Olsen, R. W., Turner, L., Ndam, N. T., ... Jensen, A. T. R. (2017). Structure-Guided Identification of a Family of Dual Receptor-Binding PfEMP1 that Is Associated with Cerebral Malaria. *Cell Host & Microbe*, 21(3), 403-414. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.009>
- Leoratti, F. M. S., Durlacher, R. R., Lacerda, M. V. G., Alecrim, M. G., Ferreira, A. W., Sanchez, M. C. A., & Moraes, S. L. (2008). Pattern of humoral immune response to Plasmodium falciparum blood stages in individuals presenting different clinical expressions of malaria. *Malaria Journal*, 7, 186. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-186>
- Lepenius, B., Gaworski, I., Tartz, S., Langhorne, J., Fleischer, B., & Jacobs, T. (2007). CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal Plasmodium yoelii infections. *Microbes and Infection*, 9(6), 687-694. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.013>
- Levanon, D., Negreanu, V., Lotem, J., Bone, K. R., Brenner, O., Leshkowitz, D., & Groner, Y. (2014). Transcription factor Runx3 regulates interleukin-15-dependent natural killer cell activation. *Molecular and Cellular Biology*, 34(6), 1158-1169. <https://doi.org/10.1128/MCB.01202-13>
- Li, C., Corraliza, I., & Langhorne, J. (1999). A defect in interleukin-10 leads to enhanced malarial disease in Plasmodium chabaudi chabaudi infection in mice. *Infection and Immunity*, 67(9), 4435-4442.
- Li, C., Sanni, L. A., Omer, F., Riley, E., & Langhorne, J. (2003). Pathology of Plasmodium chabaudi chabaudi infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies. *Infection and Immunity*, 71(9), 4850-4856.
- Li, S. S., Kyei, S. K., Timm-McCann, M., Ogbomo, H., Jones, G. J., Shi, M., ... Mody, C. H. (2013). The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients. *Cell Host & Microbe*, 14(4), 387-397. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.09.007>
- Liehl, P., Meireles, P., Albuquerque, I. S., Pinkevych, M., Baptista, F., Mota, M. M., ... Prudêncio, M. (2015). Innate immunity induced by Plasmodium liver infection inhibits malaria reinfections. *Infection and Immunity*, 83(3), 1172-1180. <https://doi.org/10.1128/IAI.02796-14>
- Lin, C. S., Uboldi, A. D., Epp, C., Bujard, H., Tsuboi, T., Czabotar, P. E., & Cowman, A. F. (2016). Multiple Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate Merozoite Binding to Human Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7703-7715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.698282>

- Linke, A., Kühn, R., Müller, W., Honarvar, N., Li, C., & Langhorne, J. (1996). Plasmodium chabaudi chabaudi: differential susceptibility of gene-targeted mice deficient in IL-10 to an erythrocytic-stage infection. *Experimental Parasitology*, 84(2), 253-263. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0111>
- Liu, X. Q., Stacey, K. J., Horne-Debets, J. M., Cridland, J. A., Fischer, K., Narum, D., ... Wykes, M. N. (2012). Malaria infection alters the expression of B-cell activating factor resulting in diminished memory antibody responses and survival. *European Journal of Immunology*, 42(12), 3291-3301. <https://doi.org/10.1002/eji.201242689>
- Loharungsikul, S., Troye-Blomberg, M., Amoudruz, P., Pichyangkul, S., Yongvanitchit, K., Looareesuwan, S., ... Khusmith, S. (2008). Expression of toll-like receptors on antigen-presenting cells in patients with falciparum malaria. *Acta Tropica*, 105(1), 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.002>
- López, C., Saravia, C., Gomez, A., Hoebeker, J., & Patarroyo, M. A. (2010). Mechanisms of genetically-based resistance to malaria. *Gene*, 467(1-2), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.07.008>
- Lovegrove, F. E., Peña-Castillo, L., Mohammad, N., Liles, W. C., Hughes, T. R., & Kain, K. C. (2006). Simultaneous host and parasite expression profiling identifies tissue-specific transcriptional programs associated with susceptibility or resistance to experimental cerebral malaria. *BMC Genomics*, 7, 295. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-295>
- Loy, D. E., Liu, W., Li, Y., Learn, G. H., Plenderleith, L. J., Sundararaman, S. A., ... Hahn, B. H. (2017). Out of Africa: origins and evolution of the human malaria parasites Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *International Journal for Parasitology*, 47(2), 87-97. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.05.008>
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., & Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity*, 26(4), 503-517. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.006>
- Ludlow, L. E., Zhou, J., Tippett, E., Cheng, W.-J., Hasang, W., Rogerson, S. J., & Jaworowski, A. (2012). HIV-1 inhibits phagocytosis and inflammatory cytokine responses of human monocyte-derived macrophages to P. falciparum infected erythrocytes. *PloS One*, 7(2), e32102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032102>
- Lundie, R. J., de Koning-Ward, T. F., Davey, G. M., Nie, C. Q., Hansen, D. S., Lau, L. S., ... Heath, W. R. (2008). Blood-stage Plasmodium infection induces CD8+ T lymphocytes to parasite-expressed antigens, largely regulated by CD8alpha+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14509-14514. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806727105>
- Luyendyk, J., Olivas, O. R., Ginger, L. A., & Avery, A. C. (2002). Antigen-presenting cell function during Plasmodium yoelii infection. *Infection and Immunity*, 70(6), 2941-2949.

- Lyke, K. E., Wang, A., Dabo, A., Arama, C., Daou, M., Diarra, I., ... Sztein, M. B. (2012). Antigen-specific B memory cell responses to *Plasmodium falciparum* malaria antigens and *Schistosoma haematobium* antigens in co-infected Malian children. *PloS One*, 7(6), e37868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037868>
- Maeno, Y., Steketee, R. W., Nagatake, T., Tegoshi, T., Desowitz, R. S., Wirima, J. J., & Aikawa, M. (1993). Immunoglobulin complex deposits in *Plasmodium falciparum*-infected placentas from Malawi and Papua New Guinea. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(5), 574-580.
- Mahmoudi, S., & Keshavarz, H. (2017). Efficacy of phase 3 trial of RTS, S/AS01 malaria vaccine: The need for an alternative development plan. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 1-4. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1295906>
- Maketa, V., Mavoko, H. M., da Luz, R. I., Zanga, J., Lubiba, J., Kalonji, A., ... Van Geertruyden, J.-P. (2015). The relationship between *Plasmodium* infection, anaemia and nutritional status in asymptomatic children aged under five years living in stable transmission zones in Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Malaria Journal*, 14, 83. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0595-5>
- Malaria Genomic Epidemiology Network, Band, G., Rockett, K. A., Spencer, C. C. A., & Kwiatkowski, D. P. (2015). A novel locus of resistance to severe malaria in a region of ancient balancing selection. *Nature*, 526(7572), 253-257. <https://doi.org/10.1038/nature15390>
- Malaria Genomic Epidemiology Network, & Malaria Genomic Epidemiology Network. (2014). Reappraisal of known malaria resistance loci in a large multicenter study. *Nature Genetics*, 46(11), 1197-1204. <https://doi.org/10.1038/ng.3107>
- Males, S., Gaye, O., & Garcia, A. (2008). Long-term asymptomatic carriage of *Plasmodium falciparum* protects from malaria attacks: a prospective study among Senegalese children. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(4), 516-522. <https://doi.org/10.1086/526529>
- Malik, E. M., Hanafi, K., Ali, S. H., Ahmed, E. S., & Mohamed, K. A. (2006). Treatment-seeking behaviour for malaria in children under five years of age: implication for home management in rural areas with high seasonal transmission in Sudan. *Malaria Journal*, 5, 60. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-5-60>
- Manjurano, A., Clark, T. G., Nadjm, B., Mtove, G., Wangai, H., Sepulveda, N., ... Drakeley, C. (2012). Candidate human genetic polymorphisms and severe malaria in a Tanzanian population. *PloS One*, 7(10), e47463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047463>

- Marquet, S., Conte, I., Poudiougou, B., Argiro, L., Dessein, H., Couturier, C., ... Dessein, A. J. (2017). A Functional IL22 Polymorphism (rs2227473) Is Associated with Predisposition to Childhood Cerebral Malaria. *Scientific Reports*, 7, 41636. <https://doi.org/10.1038/srep41636>
- Marquet, S., Doumbo, O., Cabantous, S., Poudiougou, B., Argiro, L., Safeukui, I., ... Dessein, A. J. (2008). A functional promoter variant in IL12B predisposes to cerebral malaria. *Human Molecular Genetics*, 17(14), 2190-2195. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn118>
- Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., ... Peshu, N. (1995). Indicators of life-threatening malaria in African children. *The New England Journal of Medicine*, 332(21), 1399-1404. <https://doi.org/10.1056/NEJM199505253322102>
- Marsh, K., & Kinyanjui, S. (2006). Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunology*, 28(1-2), 51-60. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x>
- Mastelic, B., do Rosario, A. P. F., Veldhoen, M., Renauld, J. C., Jarra, W., Sponaas, A.-M., ... Langhorne, J. (2012). IL-22 Protects Against Liver Pathology and Lethality of an Experimental Blood-Stage Malaria Infection. *Frontiers in Immunology*, 3, 85. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00085>
- Matangila, J. R., Lufuluabo, J., Ibalanky, A. L., Inocência da Luz, R. A., Lutumba, P., & Van Geertruyden, J.-P. (2014). Asymptomatic Plasmodium falciparum infection is associated with anaemia in pregnancy and can be more cost-effectively detected by rapid diagnostic test than by microscopy in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *Malaria Journal*, 13, 132. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-132>
- Mavoungou, E., Held, J., Mewono, L., & Kremsner, P. G. (2007). A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 195(10), 1521-1531. <https://doi.org/10.1086/515579>
- Mavoungou, E., Luty, A. J. F., & Kremsner, P. G. (2003). Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells in vitro. *European Cytokine Network*, 14(3), 134-142.
- McCall, M. B. B., Netea, M. G., Hermsen, C. C., Jansen, T., Jacobs, L., Golenbock, D., ... Sauerwein, R. W. (2007). Plasmodium falciparum infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(1), 162-171.
- McCall, M. B. B., & Sauerwein, R. W. (2010). Interferon- γ --central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *Journal of Leukocyte Biology*, 88(6), 1131-1143. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310137>

- McGuire, W., Hill, A. V., Allsopp, C. E., Greenwood, B. M., & Kwiatkowski, D. (1994). Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*, *371*(6497), 508-510.
<https://doi.org/10.1038/371508a0>
- McGuire, W., Knight, J. C., Hill, A. V., Allsopp, C. E., Greenwood, B. M., & Kwiatkowski, D. (1999). Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(1), 287-290. <https://doi.org/10.1086/314533>
- Medina-Rivera, A., Defrance, M., Sand, O., Herrmann, C., Castro-Mondragon, J. A., Delerce, J., ... van Helden, J. (2015). RSAT 2015: Regulatory Sequence Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W50-56.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv362>
- Meding, S. J., Cheng, S. C., Simon-Haarhaus, B., & Langhorne, J. (1990). Role of gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infection and Immunity*, *58*(11), 3671-3678.
- Ménard, R., Tavares, J., Cockburn, I., Markus, M., Zavala, F., & Amino, R. (2013). Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(10), 701-712.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3111>
- Menendez, C., Fleming, A. F., & Alonso, P. L. (2000). Malaria-related Anaemia. *Parasitology Today*, *16*(11), 469-476.
[https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01774-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01774-9)
- Mercereau-Puijalon, O., & Ménard, D. (2010). *Plasmodium vivax* and the Duffy antigen: a paradigm revisited. *Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine*, *17*(3), 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2010.06.005>
- Meshnick, S. R., & Dobson, M. J. (2001). The History of Antimalarial Drugs. In *Antimalarial Chemotherapy* (p. 15-25). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-111-4_2
- Mestas, J., & Hughes, C. C. W. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *172*(5), 2731-2738.
- Metcalf, R. L. (1973). Century of DDT. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *21*(4), 511-519.
<https://doi.org/10.1021/jf60188a040>
- Metenou, S., Dembele, B., Konate, S., Dolo, H., Coulibaly, Y. I., Diallo, A. A., ... Nutman, T. B. (2011). Filarial infection suppresses malaria-specific multifunctional Th1 and Th17 responses in malaria and filarial coinfections. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *186*(8), 4725-4733.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003778>

- Meyer, C. G., May, J., Luty, A. J., Lell, B., & Kremsner, P. G. (2002). TNFalpha-308A associated with shorter intervals of Plasmodium falciparum reinfections. *Tissue Antigens*, 59(4), 287-292.
- Michon, P., Cole-Tobian, J. L., Dabod, E., Schoepflin, S., Igu, J., Susapu, M., ... Mueller, I. (2007). The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(6), 997-1008.
- Middleton, D., & Gonzelez, F. (2010). The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology*, 129(1), 8-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03208.x>
- Milek, R. L., Roeffen, W. F., Kocken, C. H., Jansen, J., Kaan, A. M., Eling, W. M., ... Konings, R. N. (1998). Immunological properties of recombinant proteins of the transmission blocking vaccine candidate, Pfs48/45, of the human malaria parasite Plasmodium falciparum produced in Escherichia coli. *Parasite Immunology*, 20(8), 377-385.
- Milet, J., Nuel, G., Watier, L., Courtin, D., Slaoui, Y., Senghor, P., ... Garcia, A. (2010). Genome wide linkage study, using a 250K SNP map, of Plasmodium falciparum infection and mild malaria attack in a Senegalese population. *PloS One*, 5(7), e11616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011616>
- Millar, S. B., & Cox-Singh, J. (2015). Human infections with Plasmodium knowlesi—zoonotic malaria. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(7), 640-648. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.03.017>
- Miller, J. L., Sack, B. K., Baldwin, M., Vaughan, A. M., & Kappe, S. H. I. (2014). Interferon-mediated innate immune responses against malaria parasite liver stages. *Cell Reports*, 7(2), 436-447. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.018>
- Miller, L. H., Ackerman, H. C., Su, X., & Wellems, T. E. (2013). Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments. *Nature Medicine*, 19(2), 156-167. <https://doi.org/10.1038/nm.3073>
- Miller, R. L., Ikram, S., Armelagos, G. J., Walker, R., Harer, W. B., Shiff, C. J., ... Maret, S. M. (1994). Diagnosis of Plasmodium falciparum infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(1), 31-32.
- Millington, O. R., Di Lorenzo, C., Phillips, R. S., Garside, P., & Brewer, J. M. (2006). Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during Plasmodium infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *Journal of Biology*, 5(2), 5. <https://doi.org/10.1186/jbiol34>
- Millington, O. R., Gibson, V. B., Rush, C. M., Zinselmeyer, B. H., Phillips, R. S., Garside, P., & Brewer, J. M. (2007). Malaria impairs T cell clustering and immune priming despite normal signal 1 from dendritic cells. *PLoS Pathogens*, 3(10), 1380-1387. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030143>

- Min-Oo, G., Fortin, A., Tam, M.-F., Nantel, A., Stevenson, M. M., & Gros, P. (2003). Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nature Genetics*, 35(4), 357-362. <https://doi.org/10.1038/ng1260>
- Mohan, K., Moulin, P., & Stevenson, M. M. (1997). Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159(10), 4990-4998.
- Molano, A., Park, S. H., Chiu, Y. H., Nosseir, S., Bendelac, A., & Tsuji, M. (2000). Cutting edge: the IgG response to the circumsporozoite protein is MHC class II-dependent and CD1d-independent: exploring the role of GPIs in NK T cell activation and antimalarial responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(10), 5005-5009.
- Montagna, G. N., Biswas, A., Hildner, K., Matuschewski, K., & Dunay, I. R. (2015). Batf3 deficiency proves the pivotal role of CD8 α ⁺ dendritic cells in protection induced by vaccination with attenuated *Plasmodium* sporozoites. *Parasite Immunology*, 37(10), 533-543. <https://doi.org/10.1111/pim.12222>
- Montel, A. H., Bochan, M. R., Hobbs, J. A., Lynch, D. H., & Brahmi, Z. (1995). Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cellular Immunology*, 166(2), 236-246. <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.9974>
- Moore, D. V., & Lanier, J. E. (1961). Observations on two *Plasmodium falciparum* infections with an abnormal response to chloroquine. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10, 5-9.
- Morahan, G., Boutlis, C. S., Huang, D., Pain, A., Saunders, J. R., Hobbs, M. R., ... Anstey, N. M. (2002). A promoter polymorphism in the gene encoding interleukin-12 p40 (IL12B) is associated with mortality from cerebral malaria and with reduced nitric oxide production. *Genes and Immunity*, 3(7), 414-418. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363909>
- Mordmüller, B., Surat, G., Lagler, H., Chakravarty, S., Ishizuka, A. S., Lalremruata, A., ... Kremsner, P. G. (2017). Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature*, 542(7642), 445-449. <https://doi.org/10.1038/nature21060>
- Morrot, A., & Zavala, F. (2004). Effector and memory CD8⁺ T cells as seen in immunity to malaria. *Immunological Reviews*, 201, 291-303. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00175.x>
- Moyes, C. L., Henry, A. J., Golding, N., Huang, Z., Singh, B., Baird, J. K., ... Hay, S. I. (2014). Defining the Geographical Range of the *Plasmodium knowlesi* Reservoir. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(3), e2780. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002780>

- Mpina, M., Maurice, N. J., Yajima, M., Slichter, C. K., Miller, H. W., Dutta, M., ... Prlic, M. (2017). Controlled Human Malaria Infection Leads to Long-Lasting Changes in Innate and Innate-like Lymphocyte Populations. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *199*(1), 107-118. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601989>
- Mueller, I., Galinski, M. R., Tsuboi, T., Arevalo-Herrera, M., Collins, W. E., & King, C. L. (2013). Natural acquisition of immunity to Plasmodium vivax: epidemiological observations and potential targets. *Advances in Parasitology*, *81*, 77-131. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00003-5>
- Müller, K., Gibbins, M. P., Matuschewski, K., & Hafalla, J. C. R. (2017). Evidence of cross-stage CD8+ T cell epitopes in malaria pre-erythrocytic and blood stage infections. *Parasite Immunology*, *39*(7). <https://doi.org/10.1111/pim.12434>
- Murphy, K. M., & Stockinger, B. (2010). Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nature Immunology*, *11*(8), 674-680. <https://doi.org/10.1038/ni.1899>
- Murray, S. A., Mohar, I., Miller, J. L., Brempelis, K. J., Vaughan, A. M., Kappe, S. H. I., & Crispe, I. N. (2015). CD40 Is Required for Protective Immunity against Liver Stage Plasmodium Infection. *The Journal of Immunology*, *194*(5), 2268-2279. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401724>
- Mutsigiri-Murewanhema, F., Mafaune, P. T., Shambira, G., Juru, T., Bangure, D., Mungati, M., ... Tshimanga, M. (2017). Factors associated with severe malaria among children below ten years in Mutasa and Nyanga districts, Zimbabwe, 2014-2015. *Pan African Medical Journal*, *27*(23). <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.27.23.10957>
- Nacher, M. (2012). Helminth-infected patients with malaria: a low profile transmission hub? *Malaria Journal*, *11*, 376. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-376>
- Nahrendorf, W., Scholzen, A., Bijker, E. M., Teirlinck, A. C., Bastiaens, G. J. H., Schats, R., ... Sauerwein, R. W. (2014). Memory B-cell and antibody responses induced by Plasmodium falciparum sporozoite immunization. *The Journal of Infectious Diseases*, *210*(12), 1981-1990. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu354>
- Naka, I., Patarapotikul, J., Tokunaga, K., Hananantachai, H., Tsuchiya, N., & Ohashi, J. (2009). A replication study of the association between the IL12B promoter allele CTCTAA and susceptibility to cerebral malaria in Thai population. *Malaria Journal*, *8*(1), 290. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-290>
- Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., & O'Shea, J. J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Current Opinion in Immunology*, *24*(3), 297-302. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.01.014>
- Nankabirwa, J., Wandera, B., Kiwanuka, N., Staedke, S. G., Kanya, M. R., & Brooker, S. J. (2013). Asymptomatic Plasmodium infection and cognition among primary schoolchildren in a high malaria transmission setting in

Uganda. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), 1102-1108.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0633>

Nation Unis. (2015). *Rapport 2015 : Objectifs du Millénaire pour le développement*.

Ndiaye, R., Sakuntabhai, A., Casadémont, I., Rogier, C., Tall, A., Trape, J.-F., ... Julier, C. (2005). Genetic study of ICAM1 in clinical malaria in Senegal. *Tissue Antigens*, 65(5), 474-480. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2005.00388.x>

Ndounga, M., Mayengue, P. I., Casimiro, P. N., Koukouikila-Koussounda, F., Bitemo, M., Matondo, B. D., ... Ntoumi, F. (2015). Artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine for the treatment of acute uncomplicated malaria in Congolese children under 10 years old living in a suburban area: a randomized study. *Malaria Journal*, 14(1), 423. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0918-6>

Nduati, E. W., Ng, D. H. L., Ndungu, F. M., Gardner, P., Urban, B. C., & Langhorne, J. (2010). Distinct kinetics of memory B-cell and plasma-cell responses in peripheral blood following a blood-stage *Plasmodium chabaudi* infection in mice. *PLoS One*, 5(11), e15007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015007>

Nerlich, A. G., Schraut, B., Dittrich, S., Jelinek, T., & Zink, A. R. (2008). *Plasmodium falciparum* in ancient Egypt. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1317-1319. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080235>

Newman, K. C., Korbil, D. S., Hafalla, J. C., & Riley, E. M. (2006). Cross-talk with myeloid accessory cells regulates human natural killer cell interferon-gamma responses to malaria. *PLoS Pathogens*, 2(12), e118. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020118>

Nganou-Makamdop, K., van Gemert, G.-J., Arens, T., Hermsen, C. C., & Sauerwein, R. W. (2012). Long term protection after immunization with *P. berghei* sporozoites correlates with sustained IFN γ responses of hepatic CD8⁺ memory T cells. *PLoS One*, 7(5), e36508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036508>

Nguyen, K. B., Salazar-Mather, T. P., Dalod, M. Y., Van Deusen, J. B., Wei, X., Liew, F. Y., ... Biron, C. A. (2002). Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(8), 4279-4287.

Nicholas, D. M. (2014). *The Evolution of the Medieval World: Society, Government & Thought in Europe 312-1500*. Routledge.

Nielsen, C. M., White, M. J., Goodier, M. R., & Riley, E. M. (2013). Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Frontiers in Immunology*, 4, 422. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00422>

- Nitcheu, J., Bonduelle, O., Combadiere, C., Tefit, M., Seilhean, D., Mazier, D., & Combadiere, B. (2003). Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *170*(4), 2221-2228.
- Nosten, F., van Vugt, M., Price, R., Luxemburger, C., Thway, K. L., Brockman, A., ... White, N. J. (2000). Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of Plasmodium falciparum malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *Lancet (London, England)*, *356*(9226), 297-302.
- Nussler, A., Pied, S., Goma, J., Rénia, L., Miltgen, F., Grau, G. E., & Mazier, D. (1991). TNF inhibits malaria hepatic stages in vitro via synthesis of IL-6. *International Immunology*, *3*(4), 317-321.
- Oakley, M. S., Gerald, N., McCutchan, T. F., Aravind, L., & Kumar, S. (2011). Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends in Parasitology*, *27*(10), 442-449. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.06.004>
- Oakley, M. S., Sahu, B. R., Lotspeich-Cole, L., Solanki, N. R., Majam, V., Pham, P. T., ... Morris, S. L. (2013). The transcription factor T-bet regulates parasitemia and promotes pathogenesis during Plasmodium berghei ANKA murine malaria. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(9), 4699-4708. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300396>
- Obeid, M., Franetich, J.-F., Lorthiois, A., Gego, A., Grüner, A. C., Tefit, M., ... Mazier, D. (2013). Skin-draining lymph node priming is sufficient to induce sterile immunity against pre-erythrocytic malaria. *EMBO Molecular Medicine*, *5*(2), 250-263. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201677>
- Obeng-Adjei, N., Portugal, S., Tran, T. M., Yazew, T. B., Skinner, J., Li, S., ... Crompton, P. D. (2015). Circulating Th1-Cell-type Tfh Cells that Exhibit Impaired B Cell Help Are Preferentially Activated during Acute Malaria in Children. *Cell Reports*, *13*(2), 425-439. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.004>
- Ocaña-Morgner, C., Mota, M. M., & Rodriguez, A. (2003). Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *197*(2), 143-151.
- O'Donnell, R. A., de Koning-Ward, T. F., Burt, R. A., Bockarie, M., Reeder, J. C., Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2001). Antibodies against merozoite surface protein (MSP)-1(19) are a major component of the invasion-inhibitory response in individuals immune to malaria. *The Journal of Experimental Medicine*, *193*(12), 1403-1412.
- Oeuvray, C., Theisen, M., Rogier, C., Trape, J. F., Jepsen, S., & Druilhe, P. (2000). Cytophilic immunoglobulin responses to Plasmodium falciparum glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal. *Infection and Immunity*, *68*(5), 2617-2620.

- Ohashi, J., Naka, I., Patarapotikul, J., Hananantachai, H., Looareesuwan, S., & Tokunaga, K. (2001). Absence of association between the allele coding methionine at position 29 in the N-terminal domain of ICAM-1 (ICAM-1(Kilifi)) and severe malaria in the northwest of Thailand. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 54(3), 114-116.
- Ohno, S., Sato, T., Kohu, K., Takeda, K., Okumura, K., Satake, M., & Habu, S. (2008). Runx proteins are involved in regulation of CD122, Ly49 family and IFN-gamma expression during NK cell differentiation. *International Immunology*, 20(1), 71-79. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm120>
- Ohno, T., & Nishimura, M. (2004). Detection of a new cerebral malaria susceptibility locus, using CBA mice. *Immunogenetics*, 56(9), 675-678. <https://doi.org/10.1007/s00251-004-0739-1>
- Ohta, K., Goto, H., Matsumoto, Y., Yumine, N., Tsurudome, M., & Nishio, M. (2016). Graf1 Controls the Growth of Human Parainfluenza Virus Type 2 through Inactivation of RhoA Signaling. *Journal of Virology*, 90(20), 9394-9405. <https://doi.org/10.1128/JVI.01471-16>
- Olaniyan, S. A., Amodu, O. K., Yindom, L.-M., Conway, D. J., Aka, P., Bakare, A. A., & Omotade, O. O. (2014). Killer-cell immunoglobulin-like receptors and falciparum malaria in southwest Nigeria. *Human Immunology*, 75(8), 816-821. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.06.002>
- Oliveira, G. A., Kumar, K. A., Calvo-Calle, J. M., Othoro, C., Altszuler, D., Nussenzweig, V., & Nardin, E. H. (2008). Class II-restricted protective immunity induced by malaria sporozoites. *Infection and Immunity*, 76(3), 1200-1206. <https://doi.org/10.1128/IAI.00566-07>
- Omer, F. M., & Riley, E. M. (1998). Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(1), 39-48.
- Orago, A. S., & Facer, C. A. (1991). Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for Plasmodium falciparum erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. *Clinical and Experimental Immunology*, 86(1), 22-29.
- Orengo, J. M., Wong, K. A., Ocaña-Morgner, C., & Rodriguez, A. (2008). A Plasmodium yoelii soluble factor inhibits the phenotypic maturation of dendritic cells. *Malaria Journal*, 7, 254. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-254>
- Osier, F. H. A., Fegan, G., Polley, S. D., Murungi, L., Verra, F., Tetteh, K. K. A., ... Marsh, K. (2008). Breadth and magnitude of antibody responses to multiple Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with protection from clinical malaria. *Infection and Immunity*, 76(5), 2240-2248. <https://doi.org/10.1128/IAI.01585-07>

- Osier, F. H., Feng, G., Boyle, M. J., Langer, C., Zhou, J., Richards, J. S., ... Beeson, J. G. (2014). Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Medicine*, *12*, 108. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-108>
- O'Sullivan, J. M., Preston, R. J. S., O'Regan, N., & O'Donnell, J. S. (2016). Emerging roles for hemostatic dysfunction in malaria pathogenesis. *Blood*, *127*(19), 2281-2288. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-636464>
- Overstreet, M. G., Chen, Y.-C., Cockburn, I. A., Tse, S.-W., & Zavala, F. (2011). CD4+ T Cells Modulate Expansion and Survival but Not Functional Properties of Effector and Memory CD8+ T Cells Induced by Malaria Sporozoites. *PLOS ONE*, *6*(1), e15948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015948>
- Parham, P., Norman, P. J., Abi-Rached, L., & Guethlein, L. A. (2012). Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *367*(1590), 800-811. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0266>
- Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A., ... Golenbock, D. T. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(6), 1919-1924. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608745104>
- Pasloske, B. L., & Howard, R. J. (1994). Malaria, the red cell, and the endothelium. *Annual Review of Medicine*, *45*, 283-295. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.45.1.283>
- Pasvolsky, R., Grabovsky, V., Giagulli, C., Shulman, Z., Shamri, R., Feigelson, S. W., ... Alon, R. (2008). RhoA is involved in LFA-1 extension triggered by CXCL12 but not in a novel outside-in LFA-1 activation facilitated by CXCL9. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *180*(5), 2815-2823.
- Patel, S. N., Serghides, L., Smith, T. G., Febbraio, M., Silverstein, R. L., Kurtz, T. W., ... Kain, K. C. (2004). CD36 mediates the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes by rodent macrophages. *The Journal of Infectious Diseases*, *189*(2), 204-213. <https://doi.org/10.1086/380764>
- Patz, J. A., & Olson, S. H. (2006). Malaria risk and temperature: influences from global climate change and local land use practices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(15), 5635-5636. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601493103>

- Patz, J. A., Olson, S. H., Uejio, C. K., & Gibbs, H. K. (2008). Disease emergence from global climate and land use change. *The Medical Clinics of North America*, 92(6), 1473-1491, xii.
<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2008.07.007>
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., ... Moretta, A. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(10), 1505-1516.
- Pérez-Mazliah, D., Ng, D. H. L., Freitas do Rosário, A. P., McLaughlin, S., Mastelic-Gavillet, B., Sodenkamp, J., ... Langhorne, J. (2015). Disruption of IL-21 signaling affects T cell-B cell interactions and abrogates protective humoral immunity to malaria. *PLoS Pathogens*, 11(3), e1004715.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004715>
- Pérez-Mazliah, D., Nguyen, M. P., Hosking, C., McLaughlin, S., Lewis, M. D., Tumwine, I., ... Langhorne, J. (2017). Follicular Helper T Cells are Essential for the Elimination of Plasmodium Infection. *EBioMedicine*.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.08.030>
- Pérignon, J. L., & Druilhe, P. (1994). Immune mechanisms underlying the premunition against Plasmodium falciparum malaria. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 89 Suppl 2, 51-53.
- Perkins, D. J., Were, T., Davenport, G. C., Kempaiah, P., Hittner, J. B., & Ong'echa, J. M. (2011). Severe Malarial Anemia: Innate Immunity and Pathogenesis. *International Journal of Biological Sciences*, 7(9), 1427-1442.
- Perlmann, P., Perlmann, H., Looareesuwan, S., Krudsood, S., Kano, S., Matsumoto, Y., ... Aikawa, M. (2000). Contrasting functions of IgG and IgE antimalarial antibodies in uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(3), 373-377.
- Perry, J. A., Rush, A., Wilson, R. J., Olver, C. S., & Avery, A. C. (2004). Dendritic cells from malaria-infected mice are fully functional APC. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(1), 475-482.
- Phawong, C., Ouma, C., Tangteerawatana, P., Thongshoob, J., Were, T., Mahakunkijcharoen, Y., ... Khusmith, S. (2010). Haplotypes of IL12B promoter polymorphisms condition susceptibility to severe malaria and functional changes in cytokine levels in Thai adults. *Immunogenetics*, 62(6), 345-356.
<https://doi.org/10.1007/s00251-010-0439-y>
- Phillips, R. E., & Pasvol, G. (1992). Anaemia of Plasmodium falciparum malaria. *Baillière's Clinical Haematology*, 5(2), 315-330. [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(11\)80022-3](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(11)80022-3)
- Phyo, A. P., Ashley, E. A., Anderson, T. J. C., Bozdech, Z., Carrara, V. I., Sripawat, K., ... Nosten, F. (2016). Declining Efficacy of Artemisinin Combination Therapy Against P. Falciparum Malaria on the Thai-Myanmar

- Border (2003-2013): The Role of Parasite Genetic Factors. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 63(6), 784-791. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw388>
- Pichyangkul, S., Yongvanitchit, K., Kum-arb, U., Hemmi, H., Akira, S., Krieg, A. M., ... Miller, R. S. (2004). Malaria blood stage parasites activate human plasmacytoid dendritic cells and murine dendritic cells through a Toll-like receptor 9-dependent pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(8), 4926-4933.
- Pied, S., Roland, J., Louise, A., Voegtle, D., Soulard, V., Mazier, D., & Cazenave, P. A. (2000). Liver CD4-CD8-NK1.1+ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164(3), 1463-1469.
- Pinzon-Charry, A., Woodberry, T., Kienzle, V., McPhun, V., Minigo, G., Lampah, D. A., ... Good, M. F. (2013). Apoptosis and dysfunction of blood dendritic cells in patients with falciparum and vivax malaria. *Journal of Experimental Medicine*, 210(8), 1635-1646. <https://doi.org/10.1084/jem.20121972>
- Podoba, J. E., & Stevenson, M. M. (1991). CD4+ and CD8+ T lymphocytes both contribute to acquired immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS. *Infection and Immunity*, 59(1), 51-58.
- Poinar, G. (2005). Plasmodium dominicana n. sp. (Plasmodiidae: Haemospororida) from Tertiary Dominican amber. *Systematic Parasitology*, 61(1), 47-52. <https://doi.org/10.1007/s11230-004-6354-6>
- Poinar, G. (2016). What Fossils Reveal About the Protozoa Progenitors, Geographic Provinces, and Early Hosts of Malarial Organisms. *American Entomologist*, 62(1), 22-25. <https://doi.org/10.1093/ae/tmw006>
- Poinar, G., & Telford, S. R. (2005). Paleohaemoproteus burmaces gen. n., sp. n. (Haemospororida: Plasmodiidae) from an Early Cretaceous biting midge (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasitology*, 131(Pt 1), 79-84.
- Porcherie, A., Mathieu, C., Peronet, R., Schneider, E., Claver, J., Commere, P.-H., ... Mécheri, S. (2011). Critical role of the neutrophil-associated high-affinity receptor for IgE in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Journal of Experimental Medicine*, jem.20110845. <https://doi.org/10.1084/jem.20110845>
- Portugal, S., Moebius, J., Skinner, J., Doumbo, S., Doumtabe, D., Kone, Y., ... Crompton, P. D. (2014). Exposure-dependent control of malaria-induced inflammation in children. *PLoS Pathogens*, 10(4), e1004079. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004079>
- Potter, S., Chan-Ling, T., Ball, H. J., Mansour, H., Mitchell, A., Maluish, L., & Hunt, N. H. (2006). Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *International Journal for Parasitology*, 36(4), 485-496. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.12.005>

- Potter, S., Chaudhri, G., Hansen, A., & Hunt, N. H. (1999). Fas and perforin contribute to the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 4(6), 333-335.
<https://doi.org/10.1179/135100099101535070>
- Prakash, D., Fesel, C., Jain, R., Cazenave, P.-A., Mishra, G. C., & Pied, S. (2006). Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(2), 198-207. <https://doi.org/10.1086/504720>
- Presnell, S. R., Zhang, L., Chlebowy, C. N., Al-Attar, A., & Lutz, C. T. (2012). Differential transcription factor use by the KIR2DL4 promoter under constitutive and IL-2/15-treated conditions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(9), 4394-4404. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103352>
- Purohit, P., Mohanty, P. K., Patel, S., Das, P., Das, K., & Panigrahi, J. (2017). Association of CD40L gene polymorphism with severe Plasmodium falciparum malaria in Indian population. *Journal of Vector Borne Diseases*, 54(1), 74-79.
- Radtke, A. J., Tse, S.-W., & Zavala, F. (2015). From the draining lymph node to the liver: the induction and effector mechanisms of malaria-specific CD8+ T cells. *Seminars in Immunopathology*, 37(3), 211-220.
<https://doi.org/10.1007/s00281-015-0479-3>
- Raghavendra, K., Barik, T. K., Reddy, B. P. N., Sharma, P., & Dash, A. P. (2011). Malaria vector control: from past to future. *Parasitology Research*, 108(4), 757-779. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2232-0>
- Rajahram, G. S., Barber, B. E., William, T., Menon, J., Anstey, N. M., & Yeo, T. W. (2012). Deaths due to Plasmodium knowlesi malaria in Sabah, Malaysia: association with reporting as Plasmodium malariae and delayed parenteral artesunate. *Malaria Journal*, 11, 284. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-284>
- Rayner, J. C. (2015). Plasmodium malariae Malaria: From Monkey to Man? *EBioMedicine*, 2(9), 1023-1024.
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.08.035>
- Reddy, K. S., Amlabu, E., Pandey, A. K., Mitra, P., Chauhan, V. S., & Gaur, D. (2015). Multiprotein complex between the GPI-anchored CyRPA with PfRH5 and PfRipr is crucial for Plasmodium falciparum erythrocyte invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(4), 1179-1184.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1415466112>
- Reece, W. H. H., Pinder, M., Gothard, P. K., Milligan, P., Bojang, K., Doherty, T., ... Hill, A. V. S. (2004). A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural Plasmodium falciparum infection and disease. *Nature Medicine*, 10(4), 406-410.
<https://doi.org/10.1038/nm1009>

- Rénia, L., Grillot, D., Marussig, M., Corradin, G., Miltgen, F., Lambert, P. H., ... Del Giudice, G. (1993). Effector functions of circumsporozoite peptide-primed CD4⁺ T cell clones against *Plasmodium yoelii* liver stages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *150*(4), 1471-1478.
- Retief, F., & Cilliers, L. (2006). Periodic pyrexia and malaria in antiquity. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, *96*(8), 684, 686-688.
- Rhee, M. S., Akanmori, B. D., Waterfall, M., & Riley, E. M. (2001). Changes in cytokine production associated with acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical and Experimental Immunology*, *126*(3), 503-510.
- Richards, J. S., & Beeson, J. G. (2009). The future for blood-stage vaccines against malaria. *Immunology and Cell Biology*, *87*(5), 377-390. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.27>
- Riglar, D. T., Richard, D., Wilson, D. W., Boyle, M. J., Dekiwadia, C., Turnbull, L., ... Baum, J. (2011). Super-resolution dissection of coordinated events during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *Cell Host & Microbe*, *9*(1), 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.12.003>
- Rihet, P., Abel, L., Traoré, Y., Traoré-Leroux, T., Aucan, C., & Fumoux, F. (1998). Human malaria: segregation analysis of blood infection levels in a suburban area and a rural area in Burkina Faso. *Genetic Epidemiology*, *15*(5), 435-450. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2272\(1998\)15:5<435::AID-GEPI1>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2272(1998)15:5<435::AID-GEPI1>3.0.CO;2-#)
- Rihet, P., Traoré, Y., Abel, L., Aucan, C., Traoré-Leroux, T., & Fumoux, F. (1998). Malaria in humans: *Plasmodium falciparum* blood infection levels are linked to chromosome 5q31-q33. *American Journal of Human Genetics*, *63*(2), 498-505. <https://doi.org/10.1086/301967>
- Riley, E. M., Wahl, S., Perkins, D. J., & Schofield, L. (2006). Regulating immunity to malaria. *Parasite Immunology*, *28*(1-2), 35-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00775.x>
- Riley, E. M., Williamson, K. C., Greenwood, B. M., & Kaslow, D. C. (1995). Human immune recognition of recombinant proteins representing discrete domains of the *Plasmodium falciparum* gamete surface protein, Pfs230. *Parasite Immunology*, *17*(1), 11-19.
- Risco-Castillo, V., Topçu, S., Marinach, C., Manzoni, G., Bigorgne, A. E., Briquet, S., ... Silvie, O. (2015). Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. *Cell Host & Microbe*, *18*(5), 593-603. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.006>
- Rodrigues, C. D., Hannus, M., Prudêncio, M., Martin, C., Gonçalves, L. A., Portugal, S., ... Mota, M. M. (2008). Host Scavenger Receptor SR-BI Plays a Dual Role in the Establishment of Malaria Parasite Liver Infection. *Cell Host & Microbe*, *4*(3), 271-282. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.07.012>

- Roestenberg, M., McCall, M., Mollnes, T. E., van Deuren, M., Sprong, T., Klasen, I., ... van der Ven, A. (2007). Complement activation in experimental human malaria infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(7), 643-649. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.02.023>
- Roetynck, S., Olotu, A., Simam, J., Marsh, K., Stockinger, B., Urban, B., & Langhorne, J. (2013). Phenotypic and functional profiling of CD4 T cell compartment in distinct populations of healthy adults with different antigenic exposure. *PloS One*, 8(1), e55195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055195>
- Rogier, C., Commenges, D., & Trape, J. F. (1996). Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of Plasmodium falciparum parasitemia in highly endemic populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54(6), 613-619.
- Rojo-Marcos, G., Cuadros-González, J., Gete-García, L., Gómez-Herruz, P., López-Rubio, M., & Esteban-Gutierrez, G. (2011). [Plasmodium ovale infection: description of 16 cases and a review]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(3), 204-208. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.09.004>
- Roland, J., Soulard, V., Sellier, C., Drapier, A.-M., Di Santo, J. P., Cazenave, P.-A., & Pied, S. (2006). NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(2), 1229-1239.
- Romero, P., Maryanski, J. L., Corradin, G., Nussenzweig, R. S., Nussenzweig, V., & Zavala, F. (1989). Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria. *Nature*, 341(6240), 323-326. <https://doi.org/10.1038/341323a0>
- Rono, J., Osier, F. H. A., Olsson, D., Montgomery, S., Mhoja, L., Rooth, I., ... Färnert, A. (2013). Breadth of anti-merozoite antibody responses is associated with the genetic diversity of asymptomatic Plasmodium falciparum infections and protection against clinical malaria. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(10), 1409-1416. <https://doi.org/10.1093/cid/cit556>
- Roper, M. H., Torres, R. S., Goicochea, C. G., Andersen, E. M., Guarda, J. S., Calampa, C., ... Magill, A. J. (2000). The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2), 247-256.
- Roshanravan, B., Kari, E., Gilman, R. H., Cabrera, L., Lee, E., Metcalfe, J., ... Vinetz, J. M. (2003). Endemic malaria in the Peruvian Amazon region of Iquitos. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 69(1), 45-52.

- Rottmann, M., Lavstsen, T., Mugasa, J. P., Kaestli, M., Jensen, A. T. R., Müller, D., ... Beck, H.-P. (2006). Differential expression of var gene groups is associated with morbidity caused by Plasmodium falciparum infection in Tanzanian children. *Infection and Immunity*, 74(7), 3904-3911. <https://doi.org/10.1128/IAI.02073-05>
- Roussilhon, C., Agrapart, M., Ballet, J. J., & Bensussan, A. (1990). T lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in patients with acute Plasmodium falciparum malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 162(1), 283-285.
- Rowe, J. A., Claessens, A., Corrigan, R. A., & Arman, M. (2009). Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, e16. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001082>
- RTS,S Clinical Trials Partnership. (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet (London, England)*, 386(9988), 31-45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8)
- Russell, P. F. (1968). The United States and malaria: debits and credits. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 44(6), 623-653.
- Rutledge, G. G., Böhme, U., Sanders, M., Reid, A. J., Cotton, J. A., Maiga-Ascofare, O., ... Otto, T. D. (2017). Plasmodium malariae and P. ovale genomes provide insights into malaria parasite evolution. *Nature*, 542(7639), 101-104. <https://doi.org/10.1038/nature21038>
- Ryg-Cornejo, V., Ioannidis, L. J., Ly, A., Chiu, C. Y., Tellier, J., Hill, D. L., ... Hansen, D. S. (2016). Severe Malaria Infections Impair Germinal Center Responses by Inhibiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Cell Reports*, 14(1), 68-81. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.006>
- Ryg-Cornejo, V., Nie, C. Q., Bernard, N. J., Lundie, R. J., Evans, K. J., Crabb, B. S., ... Hansen, D. S. (2013). NK cells and conventional dendritic cells engage in reciprocal activation for the induction of inflammatory responses during Plasmodium berghei ANKA infection. *Immunobiology*, 218(2), 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.018>
- Sabchareon, A., Burnouf, T., Ouattara, D., Attanath, P., Bouharoun-Tayoun, H., Chantavanich, P., ... Druilhe, P. (1991). Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45(3), 297-308.
- Sabeti, P., Usen, S., Farhadian, S., Jallow, M., Doherty, T., Newport, M., ... Kwiatkowski, D. (2002). CD40L association with protection from severe malaria. *Genes and Immunity*, 3(5), 286-291. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363877>

- Sachs, J., & Malaney, P. (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature*, 415(6872), 680-685.
<https://doi.org/10.1038/415680a>
- Sakuntabhai, A., Ndiaye, R., Casadémont, I., Peerapittayamongkol, C., Peerapittayamonkol, C., Rogier, C., ... Julier, C. (2008). Genetic determination and linkage mapping of Plasmodium falciparum malaria related traits in Senegal. *PLoS One*, 3(4), e2000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002000>
- Sallares, R. (2002). *Malaria and Rome: A History of Malaria in Ancient Italy: A History of Malaria in Ancient Italy*. OUP Oxford.
- Sauvaget, F., & Fauconnier, B. (1978). The protective effect of endogenous interferon in mouse malaria, as demonstrated by the use of anti-interferon globulins. *Biomedicine / [Publiee Pour l'A.A.I.C.I.G.]*, 29(6), 184-187.
- Schlagenhauf, P. (2004). Malaria: from prehistory to present. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18(2), 189-205. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.01.002>
- Schofield, L., McConville, M. J., Hansen, D., Campbell, A. S., Fraser-Reid, B., Grusby, M. J., & Tachado, S. D. (1999). CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5399), 225-229.
- Schofield, L., Villaquiran, J., Ferreira, A., Schellekens, H., Nussenzweig, R., & Nussenzweig, V. (1987). Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. *Nature*, 330(6149), 664-666. <https://doi.org/10.1038/330664a0>
- Schuldt, K., Kretz, C. C., Timmann, C., Sievertsen, J., Ehmen, C., Esser, C., ... Horstmann, R. D. (2011). A -436C>A polymorphism in the human FAS gene promoter associated with severe childhood malaria. *PLoS Genetics*, 7(5), e1002066. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002066>
- Schwarzer, E., Alessio, M., Ulliers, D., & Arese, P. (1998). Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. *Infection and Immunity*, 66(4), 1601-1606.
- Scott, M. J., Hoth, J. J., Stagner, M. K., Gardner, S. A., Peyton, J. C., & Cheadle, W. G. (2004). CD40-CD154 interactions between macrophages and natural killer cells during sepsis are critical for macrophage activation and are not interferon gamma dependent. *Clinical and Experimental Immunology*, 137(3), 469-477.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02547.x>
- Scrimshaw, N. S., & SanGiovanni, J. P. (1997). Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66(2), 464S-477S.

- Seder, R. A., Chang, L.-J., Enama, M. E., Zephir, K. L., Sarwar, U. N., Gordon, I. J., ... VRC 312 Study Team. (2013). Protection against malaria by intravenous immunization with a nonreplicating sporozoite vaccine. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6152), 1359-1365. <https://doi.org/10.1126/science.1241800>
- Seixas, E., Cross, C., Quin, S., & Langhorne, J. (2001). Direct activation of dendritic cells by the malaria parasite, *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *European Journal of Immunology*, *31*(10), 2970-2978. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200110\)31:10<2970::AID-IMMU2970>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200110)31:10<2970::AID-IMMU2970>3.0.CO;2-S)
- Serghides, L., Patel, S. N., Ayi, K., & Kain, K. C. (2006). Placental chondroitin sulfate A-binding malarial isolates evade innate phagocytic clearance. *The Journal of Infectious Diseases*, *194*(1), 133-139. <https://doi.org/10.1086/504721>
- Shaw, T. N., Stewart-Hutchinson, P. J., Strangward, P., Dandamudi, D. B., Coles, J. A., Villegas-Mendez, A., ... Dustin, M. L. (2015). Perivascular Arrest of CD8+ T Cells Is a Signature of Experimental Cerebral Malaria. *PLOS Pathogens*, *11*(11), e1005210. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005210>
- Shear, H. L., Srinivasan, R., Nolan, T., & Ng, C. (1989). Role of IFN-gamma in lethal and nonlethal malaria in susceptible and resistant murine hosts. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *143*(6), 2038-2044.
- Shearer, F. M., Huang, Z., Weiss, D. J., Wiebe, A., Gibson, H. S., Battle, K. E., ... Moyes, C. L. (2016). Estimating Geographical Variation in the Risk of Zoonotic *Plasmodium knowlesi* Infection in Countries Eliminating Malaria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004915>
- Shi, Y. P., Nahlen, B. L., Kariuki, S., Urdahl, K. B., McElroy, P. D., Roberts, J. M., & Lal, A. A. (2001). Fc gamma receptor IIa (CD32) polymorphism is associated with protection of infants against high-density *Plasmodium falciparum* infection. VII. Asembo Bay Cohort Project. *The Journal of Infectious Diseases*, *184*(1), 107-111. <https://doi.org/10.1086/320999>
- Shio, M. T., Tiemi Shio, M., Eisenbarth, S. C., Savaria, M., Vinet, A. F., Bellemare, M.-J., ... Olivier, M. (2009). Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. *PLoS Pathogens*, *5*(8), e1000559. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000559>
- Silver, K. L., Higgins, S. J., McDonald, C. R., & Kain, K. C. (2010). Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cellular Microbiology*, *12*(8), 1036-1045. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01492.x>
- Silvie, O., Mota, M. M., Matuschewski, K., & Prudêncio, M. (2008). Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(4), 352-359. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.005>

- Simhadri, V. R., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Topolar, D., Simhadri, V. L., Nohroudi, K., ... Pogge von Strandmann, E. (2008). Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One*, 3(10), e3377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003377>
- Simon-Haarhaus, B., Langhorne, J., & Meding, S. (1991). CD4+T cell-dependent effector mechanisms important in the immune response to the erythrocytic stages of *Plasmodium chabaudi chabaudi* (AS). *Behring Institute Mitteilungen*, (88), 94-98.
- Simpson, J. A., Aarons, L., Collins, W. E., Jeffery, G. M., & White, N. J. (2002). Population dynamics of untreated *Plasmodium falciparum* malaria within the adult human host during the expansion phase of the infection. *Parasitology*, 124(Pt 3), 247-263.
- Sinden, R. E. (1999). *Plasmodium* differentiation in the mosquito. *Parassitologia*, 41(1-3), 139-148.
- Singh, B., Kim Sung, L., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S. G., Cox-Singh, J., ... Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet (London, England)*, 363(9414), 1017-1024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15836-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15836-4)
- Singh, S., Alam, M. M., Pal-Bhowmick, I., Brzostowski, J. A., & Chitnis, C. E. (2010). Distinct external signals trigger sequential release of apical organelles during erythrocyte invasion by malaria parasites. *PLoS Pathogens*, 6(2), e1000746. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000746>
- Singh, S., Miura, K., Zhou, H., Muratova, O., Keegan, B., Miles, A., ... Long, C. A. (2006). Immunity to recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP1): protection in *Aotus nancymai* monkeys strongly correlates with anti-MSP1 antibody titer and in vitro parasite-inhibitory activity. *Infection and Immunity*, 74(8), 4573-4580. <https://doi.org/10.1128/IAI.01679-05>
- Sinha, S., Qidwai, T., Kanchan, K., Anand, P., Jha, G. N., Pati, S. S., ... Habib, S. (2008). Variations in host genes encoding adhesion molecules and susceptibility to *falciparum* malaria in India. *Malaria Journal*, 7, 250. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-250>
- Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., ... Hay, S. I. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors*, 5, 69. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-69>
- Skorokhod, O. A., Alessio, M., Mordmüller, B., Arese, P., & Schwarzer, E. (2004). Hemozoin (malarial pigment) inhibits differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated effect. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(6), 4066-4074.

- Skorokhod, O., Schwarzer, E., Grune, T., & Arese, P. (2005). Role of 4-hydroxynonenal in the hemozoin-mediated inhibition of differentiation of human monocytes to dendritic cells induced by GM-CSF/IL-4. *BioFactors (Oxford, England)*, *24*(1-4), 283-289.
- Smith, J. D. (2014). The role of PfEMP1 adhesion domain classification in Plasmodium falciparum pathogenesis research. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *195*(2), 82-87.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.07.006>
- Smith, J. D., Rowe, J. A., Higgins, M. K., & Lavstsen, T. (2013). Malaria's deadly grip: cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cellular Microbiology*, *15*(12), 1976-1983.
<https://doi.org/10.1111/cmi.12183>
- Smith, K. G. C., & Clatworthy, M. R. (2010). FcγRIIB in autoimmunity and infection: evolutionary and therapeutic implications. *Nature Reviews. Immunology*, *10*(5), 328-343. <https://doi.org/10.1038/nri2762>
- Smith, T., Killeen, G., Lengeler, C., & Tanner, M. (2004). Relationships between the outcome of Plasmodium falciparum infection and the intensity of transmission in Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *71*(2 Suppl), 80-86.
- Smith, T., Schellenberg, J. A., & Hayes, R. (1994). Attributable fraction estimates and case definitions for malaria in endemic areas. *Statistics in Medicine*, *13*(22), 2345-2358.
- Sologub, L., Kuehn, A., Kern, S., Przyborski, J., Schillig, R., & Pradel, G. (2011). Malaria proteases mediate inside-out egress of gametocytes from red blood cells following parasite transmission to the mosquito. *Cellular Microbiology*, *13*(6), 897-912. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01588.x>
- Soulard, V., Roland, J., Sellier, C., Gruner, A. C., Leite-de-Moraes, M., Franetich, J.-F., ... Pied, S. (2007). Primary infection of C57BL/6 mice with Plasmodium yoelii induces a heterogeneous response of NKT cells. *Infection and Immunity*, *75*(5), 2511-2522. <https://doi.org/10.1128/IAI.01818-06>
- Spillman, N. J., Allen, R. J. W., McNamara, C. W., Yeung, B. K. S., Winzeler, E. A., Diagana, T. T., & Kirk, K. (2013). Na⁺ Regulation in the Malaria Parasite Plasmodium falciparum Involves the Cation ATPase PfATP4 and Is a Target of the Spiroindolone Antimalarials. *Cell Host & Microbe*, *13*(2), 227-237.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.006>
- Spillman, N. J., Beck, J. R., & Goldberg, D. E. (2015). Protein export into malaria parasite-infected erythrocytes: mechanisms and functional consequences. *Annual Review of Biochemistry*, *84*, 813-841.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034157>

- Sponaas, A.-M., Belyaev, N., Falck-Hansen, M., Potocnik, A., & Langhorne, J. (2012). Transient deficiency of dendritic cells results in lack of a merozoite surface protein 1-specific CD4 T cell response during peak *Plasmodium chabaudi* blood-stage infection. *Infection and Immunity*, *80*(12), 4248-4256.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00820-12>
- Sponaas, A.-M., Cadman, E. T., Voisine, C., Harrison, V., Boonstra, A., O'Garra, A., & Langhorne, J. (2006). Malaria infection changes the ability of splenic dendritic cell populations to stimulate antigen-specific T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(6), 1427-1433. <https://doi.org/10.1084/jem.20052450>
- Srinivasan, P., Beatty, W. L., Diouf, A., Herrera, R., Ambroggio, X., Moch, J. K., ... Miller, L. H. (2011). Binding of *Plasmodium* merozoite proteins RON2 and AMA1 triggers commitment to invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(32), 13275-13280.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1110303108>
- Srivastava, B. I. S., & Srivastava, M. D. (2006). Expression of natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44, and NKp46 mRNAs and proteins by human hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Leukemia Research*, *30*(1), 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2005.06.020>
- Stanisic, D. I., Cutts, J., Eriksson, E., Fowkes, F. J. I., Rosanas-Urgell, A., Siba, P., ... Schofield, L. (2014). $\gamma\delta$ T cells and CD14⁺ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, *210*(2), 295-305. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu083>
- Stanisic, D. I., Richards, J. S., McCallum, F. J., Michon, P., King, C. L., Schoepflin, S., ... Beeson, J. G. (2009). Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. *Infection and Immunity*, *77*(3), 1165-1174. <https://doi.org/10.1128/IAI.01129-08>
- Stegmann, K. A., De Souza, J. B., & Riley, E. M. (2015). IL-18-induced expression of high-affinity IL-2R on murine NK cells is essential for NK-cell IFN- γ production during murine *Plasmodium yoelii* infection. *European Journal of Immunology*, *45*(12), 3431-3440. <https://doi.org/10.1002/eji.201546018>
- Stephens, J. W. W. (1922). A New Malaria Parasite of Man. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *6*.
- Stephens, R., Culleton, R. L., & Lamb, T. J. (2012). The contribution of *Plasmodium chabaudi* to our understanding of malaria. *Trends in Parasitology*, *28*(2), 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.10.006>
- Stephens, R., & Langhorne, J. (2010). Effector memory Th1 CD4 T cells are maintained in a mouse model of chronic malaria. *PLoS Pathogens*, *6*(11), e1001208. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001208>

- Stevenson, M. M., & Riley, E. M. (2004). Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 169-180.
<https://doi.org/10.1038/nri1311>
- Stevenson, M. M., & Tam, M. F. (1993). Differential induction of helper T cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clinical and Experimental Immunology*, 92(1), 77-83.
- Stevenson, M. M., Tam, M. F., Wolf, S. F., & Sher, A. (1995). IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(5), 2545-2556.
- Stirnadel, H. A., Stöckle, M., Felger, I., Smith, T., Tanner, M., & Beck, H. P. (1999). Malaria infection and morbidity in infants in relation to genetic polymorphisms in Tanzania. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 4(3), 187-193.
- Storm, J., & Craig, A. G. (2014). Pathogenesis of cerebral malaria— inflammation and cytoadherence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00100>
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Rennenberg, A., ... Heussler, V. T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5791), 1287-1290. <https://doi.org/10.1126/science.1129720>
- Su, Z., & Stevenson, M. M. (2000). Central role of endogenous gamma interferon in protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *Infection and Immunity*, 68(8), 4399-4406.
- Su, Z., & Stevenson, M. M. (2002). IL-12 is required for antibody-mediated protective immunity against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS malaria infection in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(3), 1348-1355.
- Suárez-Mutis, M. C., Cuervo, P., Leoratti, F. M. S., Moraes-Avila, S. L., Ferreira, A. W., Fernandes, O., & Coura, J. R. (2007). Cross sectional study reveals a high percentage of asymptomatic *Plasmodium vivax* infection in the Amazon Rio Negro area, Brazil. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo*, 49(3), 159-164.
- Sutherland, C. J. (2009). Surface antigens of *Plasmodium falciparum* gametocytes--a new class of transmission-blocking vaccine targets? *Molecular and Biochemical Parasitology*, 166(2), 93-98.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.03.007>
- Sutherland, C. J. (2016). Persistent Parasitism: The Adaptive Biology of Malariae and Ovale Malaria. *Trends in Parasitology*, 32(10), 808-819. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.07.001>

- Tachado, S. D., Gerold, P., McConville, M. J., Baldwin, T., Quilici, D., Schwarz, R. T., & Schofield, L. (1996). Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *156*(5), 1897-1907.
- Takita-Sonoda, Y., Tsuji, M., Kamboj, K., Nussenzweig, R. S., Clavijo, P., & Zavala, F. (1996). Plasmodium yoelii: peptide immunization induces protective CD4+ T cells against a previously unrecognized cryptic epitope of the circumsporozoite protein. *Experimental Parasitology*, *84*(2), 223-230.
<https://doi.org/10.1006/expr.1996.0108>
- Talman, A. M., Blagborough, A. M., & Sinden, R. E. (2010). A Plasmodium falciparum strain expressing GFP throughout the parasite's life-cycle. *PLoS One*, *5*(2), e9156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009156>
- Taniguchi, T., Md Mannoor, K., Nonaka, D., Toma, H., Li, C., Narita, M., ... Watanabe, H. (2017). A Unique Subset of $\gamma\delta$ T Cells Expands and Produces IL-10 in Patients with Naturally Acquired Immunity against Falciparum Malaria. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01288>
- Taylor, W. R. J., Hanson, J., Turner, G. D. H., White, N. J., & Dondorp, A. M. (2012). Respiratory Manifestations of Malaria. *Chest*, *142*(2), 492-505. <https://doi.org/10.1378/chest.11-2655>
- Tebo, A. E., Kremsner, P. G., & Luty, A. J. F. (2002). Fc γ receptor-mediated phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in vitro. *Clinical and Experimental Immunology*, *130*(2), 300-306.
- Teirlinck, A. C., McCall, M. B. B., Roestenberg, M., Scholzen, A., Woestenenk, R., de Mast, Q., ... Sauerwein, R. W. (2011a). Longevity and composition of cellular immune responses following experimental Plasmodium falciparum malaria infection in humans. *PLoS Pathogens*, *7*(12), e1002389.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002389>
- Teirlinck, A. C., McCall, M. B. B., Roestenberg, M., Scholzen, A., Woestenenk, R., de Mast, Q., ... Sauerwein, R. W. (2011b). Longevity and Composition of Cellular Immune Responses Following Experimental Plasmodium falciparum Malaria Infection in Humans. *PLoS Pathogens*, *7*(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002389>
- Teirlinck, A. C., Roestenberg, M., Bijker, E. M., Hoffman, S. L., Sauerwein, R. W., & Scholzen, A. (2015). Plasmodium falciparum Infection of Human Volunteers Activates Monocytes and CD16+ Dendritic Cells and Induces Upregulation of CD16 and CD1c Expression. *Infection and Immunity*, *83*(9), 3732-3739.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00473-15>

- Teo, A., Feng, G., Brown, G. V., Beeson, J. G., & Rogerson, S. J. (2016). Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. *Trends in Parasitology*, 32(11), 887-898. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.07.003>
- Teo, Y.-Y., Small, K. S., & Kwiatkowski, D. P. (2010). Methodological challenges of genome-wide association analysis in Africa. *Nature Reviews. Genetics*, 11(2), 149-160. <https://doi.org/10.1038/nrg2731>
- Tham, W.-H., Wilson, D. W., Lopaticki, S., Schmidt, C. Q., Tetteh-Quarcoo, P. B., Barlow, P. N., ... Cowman, A. F. (2010). Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17327-17332. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008151107>
- Thawani, N., Tam, M., Bellemare, M.-J., Bohle, D. S., Olivier, M., de Souza, J. B., & Stevenson, M. M. (2014). Plasmodium products contribute to severe malarial anemia by inhibiting erythropoietin-induced proliferation of erythroid precursors. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(1), 140-149. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit417>
- Thierfelder, W. E., van Deursen, J. M., Yamamoto, K., Tripp, R. A., Sarawar, S. R., Carson, R. T., ... Ihle, J. N. (1996). Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*, 382(6587), 171-174. <https://doi.org/10.1038/382171a0>
- Timmann, C., Evans, J. A., König, I. R., Kleensang, A., Rüschemdorf, F., Lenzen, J., ... Horstmann, R. D. (2007). Genome-wide linkage analysis of malaria infection intensity and mild disease. *PLoS Genetics*, 3(3), e48. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030048>
- Timmann, C., Thye, T., Vens, M., Evans, J., May, J., Ehmen, C., ... Horstmann, R. D. (2012). Genome-wide association study indicates two novel resistance loci for severe malaria. *Nature*, 489(7416), 443-446. <https://doi.org/10.1038/nature11334>
- Tjitra, E., Anstey, N. M., Sugiarto, P., Warikar, N., Kenangalem, E., Karyana, M., ... Price, R. N. (2008). Multidrug-resistant Plasmodium vivax associated with severe and fatal malaria: a prospective study in Papua, Indonesia. *PLoS Medicine*, 5(6), e128. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050128>
- Todryk, S. M., Bejon, P., Mwangi, T., Plebanski, M., Urban, B., Marsh, K., ... Flanagan, K. L. (2008). Correlation of memory T cell responses against TRAP with protection from clinical malaria, and CD4 CD25 high T cells with susceptibility in Kenyans. *PloS One*, 3(4), e2027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002027>
- Torcia, M. G., Santarlasci, V., Cosmi, L., Clemente, A., Maggi, L., Mangano, V. D., ... Modiano, D. (2008). Functional deficit of T regulatory cells in Fulani, an ethnic group with low susceptibility to Plasmodium

- falciparum malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 646-651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709969105>
- Totino, P. R. R., Daniel-Ribeiro, C. T., & Ferreira-da-Cruz, M. de F. (2016). Evidencing the Role of Erythrocytic Apoptosis in Malarial Anemia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00176>
- Touré, F. S., Bisseye, C., & Mavoungou, E. (2006). Imbalanced distribution of Plasmodium falciparum EBA-175 genotypes related to clinical status in children from Bakoumba, Gabon. *Clinical Medicine & Research*, 4(1), 7-11.
- Tran, T. M., Li, S., Doumbo, S., Doumtabe, D., Huang, C.-Y., Dia, S., ... Crompton, P. D. (2013). An intensive longitudinal cohort study of Malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to Plasmodium falciparum infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 57(1), 40-47. <https://doi.org/10.1093/cid/cit174>
- Trape, J. F., Rogier, C., Konate, L., Diagne, N., Bouganali, H., Canque, B., ... Ndiaye, P. (1994). The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51(2), 123-137.
- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., & Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature Immunology*, 10(8), 864-871. <https://doi.org/10.1038/ni.1770>
- Trigg, P. I., & Kondrachine, A. V. (1998). Commentary: malaria control in the 1990s. *Bulletin of the World Health Organization*, 76(1), 11-16.
- Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Advances in Immunology*, 47, 187-376.
- Troye-Blomberg, M., Andersson, G., Stoczowska, M., Shabo, R., Romero, P., Patarroyo, M. E., ... Perlmann, P. (1985). Production of IL 2 and IFN-gamma by T cells from malaria patients in response to Plasmodium falciparum or erythrocyte antigens in vitro. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 135(5), 3498-3504.
- Troye-Blomberg, M., Riley, E. M., Kabilan, L., Holmberg, M., Perlmann, H., Andersson, U., ... Perlmann, P. (1990). Production by activated human T cells of interleukin 4 but not interferon-gamma is associated with elevated levels of serum antibodies to activating malaria antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(14), 5484-5488.

- Troye-Blomberg, M., Riley, E. M., Perlmann, H., Andersson, G., Larsson, A., Snow, R. W., ... Greenwood, B. M. (1989). T and B cell responses of Plasmodium falciparum malaria-immune individuals to synthetic peptides corresponding to sequences in different regions of the P. falciparum antigen Pf155/RESA. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 143(9), 3043-3048.
- Tse, S.-W., Cockburn, I. A., Zhang, H., Scott, A. L., & Zavala, F. (2013). Unique transcriptional profile of liver-resident memory CD8⁺ T cells induced by immunization with malaria sporozoites. *Genes and Immunity*, 14(5), 302-309. <https://doi.org/10.1038/gene.2013.20>
- Tse, S.-W., Radtke, A. J., & Zavala, F. (2011). Induction and maintenance of protective CD8⁺ T cells against malaria liver stages: implications for vaccine development. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 106 Suppl 1, 172-178.
- Tu, Y. (2016). Artemisinin-A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 55(35), 10210-10226. <https://doi.org/10.1002/anie.201601967>
- Urban, B. C., Cordery, D., Shafi, M. J., Bull, P. C., Newbold, C. I., Williams, T. N., & Marsh, K. (2006). The Frequency of BDCA3-Positive Dendritic Cells Is Increased in the Peripheral Circulation of Kenyan Children with Severe Malaria. *Infection and Immunity*, 74(12), 6700-6706. <https://doi.org/10.1128/IAI.00861-06>
- Urban, B. C., Ferguson, D. J. P., Pain, A., Willcox, N., Plebanski, M., Austyn, J. M., & Roberts, D. J. (1999). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature*, 400(6739), 73-77. <https://doi.org/10.1038/21900>
- Urlaub, D., Höfer, K., Müller, M.-L., & Watzl, C. (2017). LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 198(5), 1944-1951. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601004>
- Van den Steen, P. E., Deroost, K., Deckers, J., Van Herck, E., Struyf, S., & Opendakker, G. (2013). Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends in Parasitology*, 29(7), 346-358. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.006>
- Vaughan, A. M., Aly, A. S. I., & Kappe, S. H. I. (2008). Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: gliding and hiding. *Cell Host & Microbe*, 4(3), 209-218. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.08.010>
- Vély, F., Golub, R., & Vivier, E. (2016). HLA-Fatal attraction. *Nature Immunology*, 17(9), 1012-1014. <https://doi.org/10.1038/ni.3541>

- Venton, G., Labiad, Y., Colle, J., Fino, A., Afridi, S., Torres, M., ... Costello, R. (2016). Natural killer cells in acute myeloid leukemia patients: from phenotype to transcriptomic analysis. *Immunologic Research*, 64(5-6), 1225-1236. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8848-0>
- Vichchathorn, P., Jenwithisuk, R., Leelaudomlapi, S., Tungpradabkul, S., Hongeng, S., Cui, L., ... Udomsangpetch, R. (2006). Induction of specific immune responses against the *Plasmodium vivax* liver-stage via in vitro activation by dendritic cells. *Parasitology International*, 55(3), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2006.04.001>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5, 520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Villegas-Mendez, A., Greig, R., Shaw, T. N., de Souza, J. B., Gwyer Findlay, E., Stumhofer, J. S., ... Couper, K. N. (2012). IFN- γ -producing CD4⁺ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8⁺ T cell accumulation within the brain. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(2), 968-979. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200688>
- Vinetz, J. M., Li, J., McCutchan, T. F., & Kaslow, D. C. (1998). *Plasmodium malariae* infection in an asymptomatic 74-year-old Greek woman with splenomegaly. *The New England Journal of Medicine*, 338(6), 367-371. <https://doi.org/10.1056/NEJM199802053380605>
- Vittor, A. Y., Gilman, R. H., Tielsch, J., Glass, G., Shields, T., Lozano, W. S., ... Patz, J. A. (2006). The effect of deforestation on the human-biting rate of *Anopheles darlingi*, the primary vector of *Falciparum malaria* in the Peruvian Amazon. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(1), 3-11.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., & Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 239-252. <https://doi.org/10.1038/nri3174>
- Voisine, C., Mastelic, B., Sponaas, A.-M., & Langhorne, J. (2010). Classical CD11c⁺ dendritic cells, not plasmacytoid dendritic cells, induce T cell responses to *Plasmodium chabaudi* malaria. *International Journal for Parasitology*, 40(6), 711-719. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.11.005>
- Volz, J. C., Yap, A., Sisquella, X., Thompson, J. K., Lim, N. T. Y., Whitehead, L. W., ... Cowman, A. F. (2016). Essential Role of the PfRh5/PfRipr/CyRPA Complex during *Plasmodium falciparum* Invasion of Erythrocytes. *Cell Host & Microbe*, 20(1), 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.004>
- von der Weid, T., Kopf, M., Köhler, G., & Langhorne, J. (1994). The immune response to *Plasmodium chabaudi* malaria in interleukin-4-deficient mice. *European Journal of Immunology*, 24(10), 2285-2293. <https://doi.org/10.1002/eji.1830241004>

- von der Weid, T., & Langhorne, J. (1993). The roles of cytokines produced in the immune response to the erythrocytic stages of mouse malaras. *Immunobiology*, *189*(3-4), 397-418.
- Walther, M., Jeffries, D., Finney, O. C., Njie, M., Ebonyi, A., Deininger, S., ... Riley, E. M. (2009). Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. *PLoS Pathogens*, *5*(4), e1000364. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000364>
- Walther, M., Tongren, J. E., Andrews, L., Korbel, D., King, E., Fletcher, H., ... Hill, A. V. S. (2005). Upregulation of TGF-beta, FOXP3, and CD4+CD25+ regulatory T cells correlates with more rapid parasite growth in human malaria infection. *Immunity*, *23*(3), 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.006>
- Wang, K. S., Frank, D. A., & Ritz, J. (2000). Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood*, *95*(10), 3183-3190.
- Wang, K. S., Ritz, J., & Frank, D. A. (1999). IL-2 Induces STAT4 Activation in Primary NK Cells and NK Cell Lines, But Not in T Cells. *The Journal of Immunology*, *162*(1), 299-304.
- Wang, S., Ghosh, A. K., Bongio, N., Stebbings, K. A., Lampe, D. J., & Jacobs-Lorena, M. (2012). Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(31), 12734-12739. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204158109>
- Warimwe, G. M., Keane, T. M., Fegan, G., Musyoki, J. N., Newton, C. R. J. C., Pain, A., ... Bull, P. C. (2009). Plasmodium falciparum var gene expression is modified by host immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(51), 21801-21806. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907590106>
- Wassmer, S. C., Taylor, T. E., Rathod, P. K., Mishra, S. K., Mohanty, S., Arevalo-Herrera, M., ... Smith, J. D. (2015). Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *93*(3_Suppl), 42-56. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0841>
- Waterfall, M., Black, A., & Riley, E. (1998). Gammadelta+ T cells preferentially respond to live rather than killed malaria parasites. *Infection and Immunity*, *66*(5), 2393-2398.
- Wattavidanage, J., Carter, R., Perera, K. L., Munasingha, A., Bandara, S., McGuinness, D., ... Premawansa, S. (1999). TNFalpha*2 marks high risk of severe disease during Plasmodium falciparum malaria and other infections in Sri Lankans. *Clinical and Experimental Immunology*, *115*(2), 350-355.

- Weidanz, W. P., LaFleur, G., Brown, A., Burns, J. M., Gramaglia, I., & Heyde, H. C. van der. (2010). $\gamma\delta$ T Cells but Not NK Cells Are Essential for Cell-Mediated Immunity against *Plasmodium chabaudi* Malaria. *Infection and Immunity*, 78(10), 4331-4340. <https://doi.org/10.1128/IAI.00539-10>
- Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertrapisarn, T., Tham, W.-H., de Jong, N. W. M., Harvey, K. L., ... Crabb, B. S. (2015). Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *PLoS Pathogens*, 11(2), e1004670. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004670>
- Weiss, W. R., Sedegah, M., Beaudoin, R. L., Miller, L. H., & Good, M. F. (1988). CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(2), 573-576.
- WHO. (2000). Severe falciparum malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94, 1-90. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90300-6](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90300-6)
- WHO. (2008). WHO in 60 years: a chronology of public health milestones. Consulté 20 juillet 2017, à l'adresse http://www.who.int/features/history/WHO_60th_anniversary_chronology.pdf?ua=1
- WHO. (2013). *Malaria entomology and vector control*.
- WHO. (2014). Severe Malaria. *Tropical Medicine & International Health*, 19, 7-131. https://doi.org/10.1111/tmi.12313_2
- WHO. (2016a). *World Malaria Report 2015*.
- WHO. (2016b). *World Malaria Report 2016*.
- Wikenheiser, D. J., Ghosh, D., Kennedy, B., & Stumhofer, J. S. (2016). The Costimulatory Molecule ICOS Regulates Host Th1 and Follicular Th Cell Differentiation in Response to *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS Infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 196(2), 778-791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403206>
- Wilke, A. B. B., & Marrelli, M. T. (2015). Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. *Parasites & Vectors*, 8, 342. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0959-2>
- Willcocks, L. C., Carr, E. J., Niederer, H. A., Rayner, T. F., Williams, T. N., Yang, W., ... Smith, K. G. C. (2010). A defunctioning polymorphism in FCGR2B is associated with protection against malaria but susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(17), 7881-7885. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915133107>

- Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O., & Duff, G. W. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(7), 3195-3199.
- Wong, K. A., & Rodriguez, A. (2008). Plasmodium infection and endotoxic shock induce the expansion of regulatory dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *180*(2), 716-726.
- Woodberry, T., Pinzon-Charry, A., Piera, K. A., Panpisutchai, Y., Engwerda, C. R., Doolan, D. L., ... Anstey, N. M. (2009). Human T cell recognition of the blood stage antigen Plasmodium hypoxanthine guanine xanthine phosphoribosyl transferase (HGXPRT) in acute malaria. *Malaria Journal*, *8*, 122.
<https://doi.org/10.1186/1475-2875-8-122>
- Wright, K. E., Hjerrild, K. A., Bartlett, J., Douglas, A. D., Jin, J., Brown, R. E., ... Higgins, M. K. (2014). Structure of malaria invasion protein RH5 with erythrocyte basigin and blocking antibodies. *Nature*, *515*(7527), 427-430.
<https://doi.org/10.1038/nature13715>
- Wu, X., Gowda, N. M., Kumar, S., & Gowda, D. C. (2010). Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(8), 4338-4348. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903824>
- Wykes, M. N., & Good, M. F. (2008). What really happens to dendritic cells during malaria? *Nature Reviews Microbiology*, *6*(11), 864-870. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1988>
- Yam, X. Y., Niang, M., Madnani, K. G., & Preiser, P. R. (2017). Three Is a Crowd – New Insights into Rosetting in Plasmodium falciparum. *Trends in Parasitology*, *33*(4), 309-320. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.12.012>
- Yamamoto, K., Shibata, F., Miyasaka, N., & Miura, O. (2002). The human perforin gene is a direct target of STAT4 activated by IL-12 in NK cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *297*(5), 1245-1252.
- Yamauchi, L. M., Coppi, A., Snounou, G., & Sinnis, P. (2007). Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cellular Microbiology*, *9*(5), 1215-1222. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00861.x>
- Yamazaki, A., Yasunami, M., Ofori, M., Horie, H., Kikuchi, M., Helegbe, G., ... Hirayama, K. (2011). Human leukocyte antigen class I polymorphisms influence the mild clinical manifestation of Plasmodium falciparum infection in Ghanaian children. *Human Immunology*, *72*(10), 881-888.
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.06.007>
- Yan, K.-X., Huang, Q., Fang, X., Zhang, Z.-H., Han, L., Gadaldi, K., ... Yawalkar, N. (2016). IgE and FcεRI are highly expressed on innate cells in psoriasis. *British Journal of Dermatology*, *175*(1), 122-133.
<https://doi.org/10.1111/bjd.14459>

- Yang, A. S. P., & Boddey, J. A. (2017). Molecular mechanisms of host cell traversal by malaria sporozoites. *International Journal for Parasitology*, 47(2-3), 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.002>
- Yerkovich, S. T., Wikström, M. E., Suriyaarachchi, D., Prescott, S. L., Upham, J. W., & Holt, P. G. (2007). Postnatal Development of Monocyte Cytokine Responses to Bacterial Lipopolysaccharide. *Pediatric Research*, 62(5), 547-552. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181568105>
- Yindom, L.-M., Forbes, R., Aka, P., Janha, O., Jeffries, D., Jallow, M., ... Walther, M. (2012). Killer-cell immunoglobulin-like receptors and malaria caused by *Plasmodium falciparum* in The Gambia. *Tissue Antigens*, 79(2), 104-113. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2011.01818.x>
- Yoeli, M. (1973). Sir Ronald Ross and the evolution of malaria research. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 49(8), 722-735.
- Yotoko, K. S. C., & Elisei, C. (2006). Malaria parasites (Apicomplexa, Haematozoa) and their relationships with their hosts: is there an evolutionary cost for the specialization? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44(4), 265-273. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2006.00377.x>
- Yu, X., Cai, B., Wang, M., Tan, P., Ding, X., Wu, J., ... Wang, R.-F. (2016). Cross-Regulation of Two Type I Interferon Signaling Pathways in Plasmacytoid Dendritic Cells Controls Anti-malaria Immunity and Host Mortality. *Immunity*, 45(5), 1093-1107. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.001>
- Zander, R. A., Obeng-Adjei, N., Guthmiller, J. J., Kulu, D. I., Li, J., Ongoiba, A., ... Butler, N. S. (2015). PD-1 Co-inhibitory and OX40 Co-stimulatory Crosstalk Regulates Helper T Cell Differentiation and Anti-Plasmodium Humoral Immunity. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 628-641. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.007>
- Zaw, M. T., & Lin, Z. (2016). Two sympatric types of *Plasmodium ovale* and discrimination by molecular methods. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2016.08.004>
- Zhang, L., Prather, D., Vanden Eng, J., Crawford, S., Kariuki, S., ter Kuile, F., ... Shi, Y. P. (2010). Polymorphisms in genes of interleukin 12 and its receptors and their association with protection against severe malarial anaemia in children in western Kenya. *Malaria Journal*, 9, 87. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-87>
- Zhu, J., Krishnegowda, G., & Gowda, D. C. (2005). 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 8617-8627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413539200>

THESIS RESUME

In 2015, nearly half of the world's population was at risk of malaria. With 212 million clinical cases and 429,000 deaths recorded, this multifactorial infectious disease remains a major public health problem, mainly in sub-Saharan Africa, which accounts for most of these new cases and deaths (nearly 90%). The severity and outcomes of malaria infection are influenced by complex interactions between many factors including host genetics. Malaria parasites have exerted a strong selective pressure on the human genome in endemic areas, leading to the progressive accumulation of genetic variations affecting the red blood cells and the immune system. Numerous genetic studies have been conducted in endemic regions to identify the different loci involved in the host's resistance to malaria. Among them, a genome-wide linkage analysis conducted in Burkina Faso that showed a significant linkage between the 6p21 locus and mild malaria attack. In addition to their linkage, several polymorphisms found under the linkage peak, and more precisely within TNF- α (coding for a pro-inflammatory cytokine) and NCR3 (coding for an activating receptor expressed at the surface of NK cells), were also independently associated with different sub-phenotype of mild malaria such as maximum parasitaemia or febrile attacks. These variants include TNF1304, TNF-308, TNF-238 and NCR3-412. In this thesis, we attempted to: \square confirm the association of these polymorphisms with parasitaemia and mild malaria by replicating them in a population living in the Republic of Congo, where there are limited human genetic data in relation with infectious diseases, \square characterize their cis-regulatory effect through functional and bioinformatics approaches, \square assess the association between NCR3-412 and severe malaria. In the first part we focused on TNF polymorphisms. Among the 4 polymorphisms analyzed, we found associations between 3 of them (TNF-238, TNF-244, TNF-308) and either mild malaria attack or maximum parasitemia. Molecular approaches showed that TNF-244 has a cis-regulatory effect. Indeed, based on a luciferase assays and gel retardation experiments, I observed a decreased promoter activity and an altered binding of nuclear proteins in the presence of the TNF-244A variant. In addition, bioinformatics analyses suggested a cooperative effect of TNF-244 and TNF-238 in modifying the binding of at least one transcription factor, including STAT3. In the second part we looked at NCR3-412. We confirmed the association of this polymorphism with both mild malaria and the number of febrile episodes in Congo. Functional approaches have also shown that NCR3-412 has a cis-regulatory effect. Indeed, Luciferase assay and EMSA results indicated a decreased promoter activity and an altered binding of two nuclear protein complexes in the presence of the NCR3-412C allele. Finally, after in silico identification of transcription factor candidates, pull-down western blot experiments confirmed that both STAT4 and RUNX3 bind the region encompassing rs2736191 with a higher affinity for the G allele. To our knowledge, this is the first report that explored the functional role of rs2736191. These results support the hypothesis that a genetic variation within a natural killer cell activating receptor alters malaria resistance in humans. We therefore wanted to assess whether this polymorphism is also involved in resistance to the severe forms of malaria in a Senegalese population, but we did not detect any association between NCR3-412 and neither severe anemia nor cerebral malaria, suggesting other mechanisms involved.

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

En 2015, plus de la moitié de la population mondiale était exposé au risque de contracter le paludisme. Avec 212 millions de cas cliniques et 429000 décès enregistrés, cette maladie infectieuse multifactorielle reste un problème de santé publique majeur, principalement en Afrique subsaharienne qui compte la plupart de ces nouveaux cas et décès. La sévérité et le devenir de l'infection palustre sont influencés par des interactions complexes entre de nombreux facteurs parmi lesquelles la génétique de l'hôte. En effet, les parasites du paludisme ont exercé une forte pression sélective sur le génome humain dans les zones endémiques, conduisant à l'accumulation progressive de variations génétiques touchant les globules rouges mais aussi le système immunitaire. De nombreuses études génétiques ont été menées dans les régions endémiques afin d'identifier les différents loci impliqués dans la résistance de l'hôte au paludisme. Parmi celle-ci, une étude de liaison pangénomique conduite au Burkina Faso a permis d'identifier une liaison génétique significative entre le locus 6p21 et la forme simple du paludisme. En plus de leur liaison, plusieurs polymorphismes trouvés sous le pic de liaison, et plus précisément, au sein du TNF et du NCR3, ont été indépendamment associés à différents sous-phénotypes de la forme non compliquée du paludisme comme la parasitémie maximale ou l'accès fébrile. Parmi ces variants, on retrouve le TNF1304, le TNF-308, le TNF-238 et le NCR3-412. Mon projet de thèse a consisté à : confirmer l'association de ces polymorphismes avec la parasitémie et les accès palustres simples en les répliquant dans une population congolaise dans laquelle peu de données génétiques en relation avec les maladies infectieuses étaient disponibles, à caractériser leur effet cis-régulateur par des approches fonctionnelles et bio-informatiques, à déterminer s'il existe une association entre NCR3-412 et le paludisme sévère. Dans une première partie nous nous sommes intéressés aux SNPs du TNF. Nos résultats montrent que les polymorphismes TNF-308, TNF-244, et TNF-238 sont associés à la parasitémie symptomatique maximale ou aux accès palustres simples. Les approches moléculaires ont permis de montrer que le TNF-244 a un effet cis-régulateur. En effet, dans les expériences de gène-rapporteur et de gel-retard, nous avons pu observer une activité du promoteur réduite en présence du variant A ainsi qu'une fixation altérée de protéines nucléaires en présence de ce même variant. De plus, nos analyses bio-informatiques suggèrent que le TNF-244 et le TNF-238 agissent en synergie pour modifier le site de fixation pour au moins un facteur de transcription dont STAT3. Dans une seconde partie nous nous sommes intéressés au variant NCR3-412. Nous avons confirmé ici l'association de ce polymorphisme avec la forme simple du paludisme ainsi que le nombre d'accès fébrile au Congo. Les approches fonctionnelles ont également montré qu'il a un effet cis-régulateur. En outre, les résultats des expériences de gène-rapporteur et de gel-retard indiquent une activité du promoteur significativement accrue en présence de l'allèle G ainsi qu'une liaison altérée de deux complexes protéiques nucléaires en présence de l'allèle C. Enfin, après l'identification *in silico* de facteurs de transcription candidats, les expériences de pull-down/western blot ont confirmé que STAT4 et RUNX3 lient la région contenant NCR3-412 avec une plus grande affinité pour l'allèle G. Nos résultats confirment l'hypothèse selon laquelle cette variation génétique au sein d'un récepteur activateur des cellules NK altère la résistance à la forme simple du paludisme chez l'homme. Nous avons donc souhaité déterminer s'il est impliqué aussi dans la résistance au paludisme sévère dans une population sénégalaise mais nous n'avons détecté aucune association.