Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

JADE ROYO

Le 24 mars 2021

Identification des facteurs immunitaires impliqués dans la neuroinflammation et sa résolution, dans un contexte de paludisme cérébral - Rôle des réponses monocytaires

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :
PHARMA-DEV -Laboratoire Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement

Thèse dirigée par
Agnes AUBOUY

Jury

Mme Sylviane PIED, Rapporteure
Mme Nadine FIEVET, Rapporteure
M. Antoine BERRY, Examinateur
Mme Agnès AUBOUY, Directrice de thèse

RESUME

Identification des facteurs immunitaires impliqués dans la neuroinflammation et sa résolution, dans un contexte de paludisme cérébral –Rôle des réponses monocytaires

En 2020, le paludisme reste un problème majeur de santé publique. Malgré des avancées scientifiques capitales, il est encore responsable de plus de 400 000 décès chaque année, principalement chez les enfants en Afrique Sub-saharienne. Le neuropaludisme est l'une des formes les plus sévères du paludisme. Sa physiopathologie est complexe, impliquant l'adhésion des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* à l'endothélium vasculaire dans le cerveau. Ce mécanisme conduit à une obstruction du flux sanguin, une inflammation locale, une altération de la barrière hémato-encéphalique et à un éventail de réponses cellulaires visant à résoudre le processus de neuroinflammation. Parmi ces cellules, les monocytes/macrophages jouent un rôle clé de par leur capacité à s'adapter à leur microenvironnement en fonction des différents signaux qu'ils perçoivent, modulant ainsi les balances pro/anti-inflammatoire et pro/antioxydante, essentielles à la résolution du neuropaludisme. Les monocytes sont composés de trois sous-populations dont le rôle dans la physiopathologie du neuropaludisme a été peu étudié et reste à éclaircir. Pour compléter ces connaissances, une approche combinant modèle murin et études chez des patients béninois a été menée.

Une première étude a été conduite chez des enfants béninois présentant un paludisme simple, une anémie sévère palustre, ou un neuropaludisme dans le but de déterminer si les paramètres monocytaires constituent des facteurs de sévérité et/ou de risque de décès au cours d'un paludisme grave. Les pourcentages et phénotypes des sous-populations monocytaires obtenus chez les trois groupes d'enfants lors de leur admission dans les centres de santé (J0) ont été comparés. Les résultats ont permis de mettre en lumière l'implication des monocytes non classiques dans la protection vis-à-vis des formes sévères de paludisme et de confirmer l'importance du récepteur CD36 des monocytes comme facteur protecteur de sévérité et de survenue de décès.

Pour aller plus loin, un travail a ensuite été mené sur un modèle murin de neuropaludisme mis en place pour se rapprocher des conditions réelles, à savoir un traitement tardif, et débouchant sur une résolution de l'infection. Des souris C57BL/6 ont été infectées par *P. berghei ANKA* (J0) et traitées tardivement à la chloroquine. La cinétique d'évolution des sous-populations monocytaires a été suivie en termes de pourcentage et d'expression protéique et génique, à la fois dans le sang, la rate et le cerveau, jusqu'à la résolution de l'infection (J12). Les résultats suggèrent une implication des monocytes classiques et intermédiaires dans la neuroinflammation, au contraire des monocytes non classiques. A J12 était observé un nouvel afflux de monocytes intermédiaires vers le cerveau, suggérant également un rôle de cette sous-population dans la résolution tardive de la neuroinflammation. Les analyses protéique et génique ont mis en évidence une implication favorable de Nrf2, CD36, HO-1, CMH-II, COX-2 et de la 12/15-LOX dans la résolution de l'infection.

Une deuxième étude a ensuite été menée chez des enfants béninois, avec un plus grand nombre de patients et un suivi à J3 et J30. Deux groupes de sujets ont été inclus, présentant un paludisme simple (n = 94) ou un neuropaludisme (n = 65). Dans l'ensemble, les résultats indiquent que les monocytes non classiques et intermédiaires étaient respectivement impliqués dans l'amélioration clinique et la survie des patients. L'expression de CD14, CD16, CD36 et HLA-DR était un facteur protecteur vis-à-vis du neuropaludisme. De manière intéressante, nos résultats montrent également une association entre une réponse pro-oxydante moins active, la sévérité du paludisme, et la survenue de décès.

L'ensemble de ces résultats apporte un nouvel éclairage sur l'implication des monocytes/macrophages au cours du neuropaludisme.

ABSTRACT

Identification of immune factors involved in neuroinflammation and its resolution, in cerebral malaria context – Role of the monocyte responses

In 2020, malaria remains a major public health problem. Despite major scientific advances, it is still responsible for more than 400,000 deaths each year, mainly among children in Sub-Saharan Africa. Cerebral malaria is one of the most severe forms of malaria. Its physiopathology is complex, involving adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the vascular endothelium in the brain. This mechanism leads to obstruction of blood flow, local inflammation, alteration of the blood-brain barrier and a range of cellular responses aiming to resolve the neuroinflammation process. Among these cells, monocytes/macrophages play a key role due to their ability to adapt to their microenvironment according to the different signals they perceive, thus modulating the pro/anti-inflammatory and pro/antioxidant balances that are essential to the resolution of cerebral malaria. Monocytes are composed of three subpopulations whose role in the physiopathology of cerebral malaria has been little studied and remains to be clarified. To complete this knowledge, an approach combining a mouse model and studies in Beninese patients was conducted.

A first study was conducted in Beninese children with uncomplicated malaria, severe malarial anaemia, or cerebral malaria, in order to determine whether monocytic parameters are factors of severity and/or risk of death during severe malaria. The percentages and phenotypes of monocyte subpopulations obtained in the three groups of children on admission to the health centres (D0) were compared. The results highlighted the involvement of the non-classical monocytes in the protection against severe forms of malaria and confirmed the importance of the monocyte CD36 receptor as a protective factor for severity and death.

To go further, we carried out experiments on a mouse model of cerebral malaria set up to mimic real-life conditions, i.e. late treatment leading to a resolution of the infection. C57BL/6 mice were infected with *P. berghei ANKA* (D0) and treated late with chloroquine. The kinetics of the monocyte subpopulations were monitored in terms of percentage and protein and gene expression in both blood, spleen and brain until resolution of infection (D12). The results suggest an involvement of classical and intermediate monocytes in neuroinflammation, unlike non-classical monocytes. At D12 a new influx of intermediate monocytes to the brain was observed, also suggesting a role of this subpopulation in the late resolution of neuroinflammation.Protein and gene analyses showed a favourable involvement of Nrf2, CD36, HO-1, CMHII, COX-2 and 12/15-LOX in the resolution of the infection.

A second study was then conducted in Beninese children, with a larger number of patients and follow-up at D3 and D21. Two groups of subjects were included, with either uncomplicated malaria (n = 94) or cerebral malaria (n = 65). Overall, the results indicate that non-classical and intermediate monocytes were respectively involved in clinical improvement and patient survival. The expression of CD14, CD16, CD36 and HLA-DR was a protective factor against cerebral malaria. Interestingly, our results also show an association between a less active pro-oxidant response, malaria severity, and the occurrence of death.

All these results shed new light on the involvement of monocytes/macrophages in cerebral malaria.

A Dramane…

Parce qu'il y a certains souvenirs d'enfance que l'on n'oublie jamais.

REMERCIEMENTS

Enfin, après avoir travaillé 1244 jours et quelques dizaines de nuits blanches, lu des centaines (milliers ?) de lames au microscope et englouti presque autant de muffins au chocolat du Relais-H, il est enfin l'heure pour moi de remercier l'ensemble des personnes sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Un immense merci à **Agnès Aubouy**, la directrice de thèse rêvée, pour avoir fait bien plus que juste encadrer ce travail. Merci de m'avoir fait partager tes compétences scientifiques, ta rigueur et ton éthique de la recherche. Rédiger cette thèse à distance, et dans ces conditions, aurait pu virer au cauchemar, mais ton implication et ton efficacité m'a permis de vivre ces 5 derniers mois bien plus sereinement. Je tiens à m'excuser pour tous ces messages de détresse ou appels whatsapp, de nature scientifique ou personnelle, envoyés pour apaiser mes méninges et, sans doute, pour recevoir quelques paroles motivantes afin de retourner au combat. Je retiendrai surtout, ce sont tes qualités humaines si précieuses, ta disponibilité, ta confiance, et la patience dont tu as fait preuve pour me supporter plus de 3 ans dans ton bureau, entre mes nombreuses interrogations et mes remises en questions. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir accompagnée sur ce petit (mais intense) parcours de ma vie. J'espère que cette aventure continuera bien au-delà de cette thèse, à Toulouse ou au Bénin.
Merci pour ce que tu es.

Je remercie Madame **Sylviane Pied**, Directrice de Recherche au Centre d'Infection et d'Immunité de Lille ainsi que Madame **Nadine Fievet**, Chargée de recherche à l'IRD, d'avoir accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteures et d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail. Merci également à Monsieur **Antoine Berry**, PU-PH au Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur **Nicolas Blanchard** et Madame **Valériane Leroy**, membres de mon comité de suivi de thèse, pour leurs précieux conseils et tout le temps qu'ils ont su m'accorder.

Toute ma reconnaissance va également à l'ensemble de **l'équipe du projet NEUROCM** pour le travail considérable qui a été mené en amont, puis sur le terrain au Bénin durant l'année de recrutement de la cohorte, ainsi que pour toutes ces réunions scientifiques (et gastronomiques !) à Paris, Limoges et Toulouse. Quel plaisir d'être entourée de personnes compétentes, multidisciplinaires et aussi agréables que vous.

Un grand merci à **Matthieu Bergé** et **Alain** qui m'ont accompagnée dans mes premiers pas en tant qu'enseignante. Ce n'est pas si facile de passer de l'autre côté du bureau et d'enseigner en pharmacie à peine 2 mois après avoir quitté les bancs des amphis. Merci d'avoir rendu ces heures de TP de bactériologie aussi fun et pédagogiques. On a ri, beaucoup, j'ai appris, beaucoup. J'espère retrouver un jour une atmosphère de travail si chaleureuse. Merci à **Agnès Coste**, responsable de l'équipe 4 du laboratoire PHARMA-DEV au sein de laquelle j'ai effectué ma thèse, pour m'avoir aidée à intégrer cette équipe enseignante.

Je remercie également tous les autres membres de mon équipe de recherche pour ces 3 années passées à vos côtés : **Bénédicte Bertrand**, pour ton aide en PCR et la bienveillance que tu as eu en mon égard, **José Bernard**, pour les discussions dans ton bureau et tes encouragements, **Hélène Authier**, pour tes conseils, tes récits de voyages en Islande et ton goût de l'aventure, **Bernard Pipy**, pour votre enthousiasme lors de l'analyse de mes résultats et vos remarques pertinentes sur mon travail, ainsi que **Saliah Mimar** et **Lise Levèvre**.

Mention spéciale à **Philippe Batigne** ! Notre souris-man préféré et le rayon de soleil de ce laboratoire. Merci d'avoir rempli mes journées de ta bonne humeur et de tes (nombreuses) blagues (ton humour pourrait être un sujet de thèse à lui tout seul !). Merci pour cet optimisme à toute épreuve et ton incroyable efficacité, pour tout le temps que tu m'as consacré tant pour me former à l'expérimentation animale que pour me transmettre tes valeurs de la vie. Le collègue de travail idéal !

Je ne peux évidemment pas continuer sans mentionner ma merveilleuse co-thésarde, **Aissata Camara.** Avec Agnès A., on formait un sacré trio, la « malaria dream team » ! Merci pour ton aide précieuse lors de mes manip'. Je te remercie du fond du cœur pour ta douceur et ta générosité, et pour ce rire directement venu d'Afrique qui me rappelle tant mon enfance. Notre amitié est précieuse.

Un grand merci aux autres thésards du laboratoire : **Godefroy**, le king du labo, qui a réussi à survivre 3 ans dans un univers presque exclusivement féminin (rien que pour ça tu la mérites ta couronne !), croisons les doigts pour espérer fêter cet été la fin de nos doctorats respectifs ; **Mélichou**, pour tes petites maladresses qui font tout ton charme et la qualité de ta réflexion scientifique, vivement nos futures soirées jeux de société autour d'un bon repas (je ne parle pas de cordon bleu !) ; **Mouna**, pour ton mental et tout le chemin parcouru jusqu'à présent, merci d'avoir partagé avec moi certaines de tes réflexions et expériences personnelles, parce que la vie n'est pas toujours rose et que je sais que je pourrais compter sur ta bienveillance en cas de coup dur ; **Mélissa Parnight**, derrière ce sourire antillais si malicieux se cache une machine de travail et une organisation parfaite qui impose le respect. Son défaut ? Le café du matin ! ; **Marie**, notre danseuse hors pair qui nous met à jour des nouveautés musicales et hits du moment (ma culture te remercie, enfin, pas sûr…) ; **Augustin**, ton post-doc' au laboratoire a été trop court, je commençais à peine à m'habituer à tes petites vannes quotidiennes, merci pour ton naturel et ta décontraction. **Kim**, la fille des îles, calme, réfléchie et toujours prête à aider, et **Clément**, notre hypocondriaque au grand cœur, travailleur et bienveillant, bon courage pour vos thèses, c'est un sacré défi que vous allez relever, j'en suis sûre, avec brio.

Je remercie **Franck Marie-Sainte**, gestionnaire de PHARMA-DEV, pour m'avoir aidée dans toutes les démarches administratives et pour ton efficacité !

Mes remerciements vont également à **Karine Reybier**, pour me permettre de poursuivre mon parcours professionnel à ses côtés, pour sa patience, sa confiance et sa gentillesse.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin mes amis d'enfance, **les copains de Côte d'Ivoire**, mes bouakéens... Trop nombreux pour tous les citer, ils se reconnaîtront, bien évidemment. Le choix de ce sujet de thèse, comme ceux de nos multiples chemins de vie, ne sont pas dus au hasard : l'Afrique fait partie de nous.
Il est impossible pour moi de ne pas penser à **Abou Bakar Bamba**, une force de la nature, je t'admire pour ton courage, ton talent et ton humanité. Ton sourire reste gravé dans ma tête à jamais, tout comme ces moments de partage autour de ton djembé et de ta musique. Tu es une source d'inspiration. « Il y a quelque chose qui va au-delà du temps et des frontières entre nous, c'est ancré comme une façon de vivre ».

Merci également à mes amis de longue date que j'ai quelque peu délaissés depuis ces dernières années, tous mes copains du collègue et du lycée qui se reconnaitront dans **« Le Système »**. J'ai grandi et mûri avec vous. Nous avons eu la chance de traverser, ensemble, des moments si importants de nos vies. Ces instants sont inestimables.

Je remercie ma **promo de pharmacie**, auprès de laquelle j'ai passé 6 années incroyables. Merci pour ces moments de partage, d'études et de soirées. Ce sont des rencontres que l'on n'oublie jamais.
Je tiens particulièrement à remercier **Ophélie**, ma meilleure amie, mon binôme dans cette aventure. On formait une équipe de choc, inséparables dans le boulot comme dans les loisirs. Tu as été un élément essentiel à mon quotidien. Merci également à **Aurore** et **Barbara**, complétant ainsi le quatuor de l'ambiance. Un concentré d'amitié, d'éclats de rire, et de complicité.
Merci à **Benji**, pour ces moments hors du temps passés dans ton studio de la Cité U' Triolet, pour ce week-end d'intégration grandiose, pour nos puissantes interprétations de l'intégralité de la comédie musicale Notre Dame de Paris, et pour tes cours de ski pas très académiques !
Un grand merci à **Vincent**, pour ce voyage à l'autre bout du monde, du Machu Picchu au cœur du désert d'Atacama, mais également pour tes grands moments d'inspiration au ski pharma. Ces souvenirs sont enregistrés dans ma tête (et dans ma caméra, pas d'bol !) Tu resteras notre Major, le best (parmi les bizuths). Gracias Esteban por tu amistad.
J'exprime ma profonde reconnaissance au **Docteur Marc Sabatier** principalement pour sa rigueur et le sérieux de ses études ☺ Merci d'avoir été mon meilleur ami, mon frérot, mon coup de cœur amical, celui sans qui ces années pharma n'auraient pas été si… intenses ! « Toujours plus, jamais moins » comme disait-on ! Nous avons vécu ensemble de merveilleux chapitres de nos vies, partagé des moments de stress, de doutes, de fous-rires et d'instants de complicité. Merci pour cette amitié unique.

Je tiens également à remercier mes **amis toulousains** et en particulier **Mégane**, mon ancienne coloc', baroudeuse dans l'âme, pour ces sacrés moments de rigolades, nos discussions interminables et ton pyjama lapin, **Laura**, jeune femme si pétillante au sourire ravageur, **Charlène**, impossible de s'ennuyer avec elle, elle aura toujours des anecdotes complètement dingues à raconter, ainsi que **la nouvelle bande de copains** : Cantoch, Julien, Thaïs, Emeric et tous les autres… Vivement le prochain mariage, quizz, après-midi pêche ou jeux de société que l'on se construise de nouveaux souvenirs !

Un r'miaou-ciement particulier à ma panthère noire, mon petit monstre à 4 pattes, gobeur de mouche et destructeur de sapin, mais dont la présence et les ronrons m'ont permis de supporter les longues journées (~~nuits, mois !~~) de confinement à télétravailler. Il a également eu la gentillesse de ne jamais me demander « alors c'est fini cette rédaction ? »

Il est parfois plus facile d'écrire des centaines de pages scientifiques que de simples lignes de remerciements envers ses proches... Comme disait Victor (H.), « les mots manquent aux émotions ».

Alors, MERCI **mon amour**. Merci de ton soutien infaillible durant toute cette thèse et de m'avoir supportée au quotidien. Merci d'avoir pris soins de ma ligne avec ces apéros improvisés, ces pâtisseries de chez Fred', ces crêpes (j'y croyais plus), cette tarte ancestrale ou les poulets rôtis du dimanche midi. Cette année 2020, avec ses deux confinements et ses 6 mois de télétravail, nous a permis de réaliser la force de notre relation… mais également la capacité de l'être humain à revenir à un état primitif ! Alors merci d'avoir supporté mon glamour et mon style bien loin de la fashion week de Paris ☺ Tu es mon plus grand bonheur, ma précieuse moitié. Je t'aime jusqu'aux étoiles du Pic du midi (le vrai), et plus encore. La fin de cette thèse nous permettra, je l'espère, d'ouvrir un nouveau chapitre de notre vie commune, qui promet d'être aussi extraordinaire que tous les précieux instants déjà passés à tes côtés.

Merci également **Cathy** et **Jean-Marc** pour m'avoir si formidablement accueillie au sein de la famille Gonzalez, pour cette paella à tomber et pour tous ces instants de vie, simples et sincères.

Enfin, MERCI **papa**, MERCI **maman**, MERCI **Momo** (vous la voyez la larmichette ?) Merci de m'avoir fait vivre cette vie de rêve auprès de vous. Je vous dois tellement... Merci pour tous ces sacrifices, pour votre soutien financier depuis le tout début de mes études (ça commence à dater !), pour votre recul et la sagesse de vos conseils, et pour avoir été présents au quotidien et m'avoir encouragée dans toutes les aventures dans lesquelles j'avais décidé de me lancer. Merci de m'avoir transmis vos valeurs humaines, de tolérance, de liberté, d'ouverture d'esprit et de partage. Vous m'avez appris que rien n'est impossible, du moment que l'on ose y croire et que l'on se donne les moyens d'y arriver. Cette thèse est le reflet de notre réussite. Notre complicité et notre amour sont nos plus grandes forces.
Vous êtes mes piliers, mes essentiels.
Je vous aime plus que les cèpes, les huitres et le kouign amann réunis ♥.

Hey, vous savez ce que l'on dit : jamais deux sans trois !

« Quels improbables parcours vous réserve la vie dès qu'une passion vous anime ! »
Erik Orsena, Géopolitique du moustique

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **3**

TABLE DES MATIERES **7**

LISTE DES ABREVIATIONS **13**

LISTE DES FIGURES **17**

LISTE DES TABLEAUX **21**

ANNEXES **22**

INTRODUCTION GENERALE **23**

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **25**

I – LE PALUDISME A PLASMODIUM FALCIPARUM **27**

I-1. Le paludisme à travers l'histoire **27**

I-2. Impact mondial du paludisme **29**

I-3. Les acteurs **32**

I-3.1) Le parasite 32

I-3.2.1/ Classification 32

I-3.2.2/ Les différentes espèces de *Plasmodium* 33

I-3.2) Le vecteur 34

I-3.3) Cycle de développement 35

I-3.3.1/ Cycle asexué chez l'homme 35

I-3.3.2/ Cycle sexué chez le moustique 37

I-3.4) Les différents modes de transmission 38

I-3.4.1/ Contamination par le vecteur 38

I-3.4.2/ Paludisme transfusionnel 39

I-3.4.3/ Paludisme congénital ou transplacentaire 39

I-4. Tableaux cliniques et biologiques 40

I-4.1) Accès palustre simple 40

I-4.2) Accès palustres graves à *P. falciparum* 41

I-4.2.1/ Neuropaludisme 42

I-4.2.2/ Autres formes de paludismes graves 42

I-5. Diagnostics et traitements 43

I-5.1) Diagnostics 43

I-5.1.1/ Diagnostic de présomption 43

I-5.1.2/ Diagnostic de certitude 44

I-5.2) Traitements 46

I-5.2.1/ Les principaux antipaludiques et leurs cibles 46

I-5.2.2/ Traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum* 50

I-6. Prévention et lutte 52

I-6.1) Les moyens actuellement disponibles 52

I-6.1.1/ Lutte antivectorielle 52

I-6.1.2/ Traitement préventifs 53

I-6.1.3/ La recherche vaccinale 55

I-6.2) Bilan et objectifs de l'OMS 56

I-7. Résistance parasitaire 58

II – PATHOGENESE ET MECANISMES DE DEFENSE DE L'HOTE 61

II-1. Facteurs génétiques et résistance innée 61

II-2. Immunité antiplasmodiale 62

II-2.1) Immunité innée 63

II-2.1.1/ Les principales populations cellulaires 63

II-2.1.2/ Régulation de l'immunité innée 66

II-2.2) Immunité adaptative 67

II-2.2.1/ Immunité à médiation cellulaire : rôles des lymphocytes T 67

II-2.2.2/ Immunité à médiation humorale : rôle des lymphocytes B 74

II-3. Rôles des monocytes/macrophages dans la physiopathologie du neuropaludisme 77

II-3.1) Origine et différenciation 78

II-3.2) Classification et hétérogénéité des monocytes/macrophages 79

II-3.2.1/ Les trois sous-populations de monocytes 79
II-3.2.2/ La polarisation M1/M2 des macrophages 86
II-3.3) Propriétés des monocytes/macrophages 89
II-3.3.1/ La phagocytose 89
II-3.3.2/ Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) 94
II-3.3.3/ Production de cytokines 95
II-3.3.4/ Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de dérivés nitrés (RNI) 99
II-3.4) Tolérance et mémoire immunitaire des monocytes 103

II-4. Synthèse des mécanismes physiopathologiques conduisant au développement du neuropaludisme 105

II-5. Stratégies immunothérapeutiques impliquant les monocytes/macrophages 107
II-5.1) Les immunomodulateurs 107
II-5.2) Autres traitements adjuvants testés en protocole de recherche 110

PARTIE 2 : TRAVAUX DE RECHERCHE 113

INTRODUCTION 115

I – REPONSE MONOCYTAIRE CHEZ L'HOMME AU COURS DU NEUROPALUDISME, FACTEURS DE RISQUE ET DE RESOLUTION DU NEUROPALUDISME : PREMIERE ETUDE MENEE CHEZ LES PATIENTS BENINOIS PRESENTANT UN PALUDISME SIMPLE, UN NEUROPALUDISME OU UNE ANEMIE SEVERE PALUSTRE (2014-2016) : ARTICLE ROYO ET AL., SCIENTIFIC REPORTS 117

I-1. Introduction 117

I-2. Matériels et méthodes 118

I-3. Résultats et discussions 122
I-3.1) *Article Royo et al : Changes in monocytes subsets are associated with clinical outcomes in severe malarial anaemia and cerebral malaria* 122
I-3.2) Résultats annexes (non publiés) *:* 123

I-4. Conclusion 128

II – ROLE ET CARACTERISATION DES SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES AU COURS DU NEUROPALUDISME DANS UN MODELE MURIN DE RESOLUTION 143

II-1. Introduction 143

II-2. Matériels et méthodes 145

II-3. Résultats et discussions 150

II-3.1) Présentation du modèle 150

II-3.2) Cinétique des sous-populations au niveau cérébral, splénique et sanguin dans ce modèle 155

II-3.3) Caractérisation des sous-populations monocytaires dans le modèle 161

II-3.3.1/ Etude protéique 161

II-3.3.2/ Etude génique 166

II-3.4) Dosage de cytokines dans les plasmas et cerveaux totaux 172

II-4. Conclusion 176

III – ETUDE NEUROCM CHEZ DES PATIENTS PRESENTANT UN PALUDISME SIMPLE OU UN NEUROPALUDISME (2018) 179

III-1. Introduction 179

III-2. Matériels et méthodes 180

III-3. Résultats 190

III-3.1) Détermination des groupes cliniques définitifs 190

III-3.2) Caractéristiques socio-démographiques et clinico-biologiques des patients NEUROCM 191

III-3.2.1/ Analyse des critères socio-démographiques des patients 191

III-3.2.2/ Analyse des données déclaratives sur le parcours et les symptômes cliniques précédant l'accès palustre des patients 192

III-3.2.3/ Analyse des données cliniques des patients 194

III-3.2.4/ Analyse des données biologiques des patients 195

III-3.3) Cinétique des sous-populations monocytaires au cours du neuropaludisme 197

III-3.3.1/ Stratégie de gating des sous-populations monocytaires 198

III-3.3.2/ Pourcentages des sous-populations monocytaires dans chacun des groupes 200

III-3.4) Caractérisation des sous-populations monocytaires au cours du neuropaludisme 201

III-3.4.1/ Etude protéique 201

III-3.4.2/ Etude génique 205

III-3.4.3/ Etude de la capacité des monocytes à produire des ROS 210

III-3.4.4/ Dosage des cytokines et chimiokines dans les plasmas 211

III-3.4.5/ Dosages urinaires de différents marqueurs des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes 217

III-4. Discussion 220

III-5. Conclusion..... 235

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....237

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 241

ANNEXES 292

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	Anticorps
ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALOX 5/12/15	Gènes des lipoxygénases (5, 12 et 15)
ARN	Acide ribonucléique messager
ARE/EpRE	Antioxidant Response Elements/Electrophile Response Elements
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigènes
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CD	Cluster de differenciation
CIDR	Cystein-Rich Inter Domain
CM	Cerebral malaria = Paludisme cérébral
CMH I / II	Complexes Majeurs d'Histocompatibilité I / II
COX-2	Cyclooxygénase-2
CPAg	Cellules Présentatrices d'Antigènes
CPS	Chimioprévention du Paludisme Saisonnier
CQ	Chloroquine
CSP	Circumsporozoïte
CTA	Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
DDT	Dichloro Diphényl Trichloro-éthane
DHA	Dihydro-artémisinine
DP	Densité Parasitaire
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ECM	Paludisme cérébral expérimental
eCRF	electronic Case Report Form
ELISA/EIA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay / Enzyme Immune Assay
EPCR	Endothelial cell Protein C Receptor
FS	Frottis Sanguin
G6PD	Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GE	Goutte Epaisse
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GR(i)	Globules Rouges (infectés)
GSH/GSSH	Glutathion réduit / Glutathion oxydé
Hb	Hémoglobine
HIF-1α	Hypoxia-Inducible factor-1 alpha
HO-1/HMOX	Hème oxygénase/Gène de l'hème oxygénase
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFNγ	Interféron γ
IL	Interleukine
IM	Intramusculaire
IV	Intraveineux
Keap1	Kelch-like associated protein 1
LB / LT	Lymphocyte B / T
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LPS	Lipopolysaccharide
LTB4	Leucotriène B4
LXA4	Lipoxine A4
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1 (également appelée CCL2)
MSP	Protéine de Surface du Mérozoïte
MII	Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NCF1	Gène de la p47phox
NK (T)	Natural Killer (T)
$NO^{\cdot}$	Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase ou NO-synthase
NOX	NADPH-oxydase
NQO1	NAD(P)H déshydrogénase quinone 1
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns = Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBMC	Cellules mononuclées du sang périphérique
*Pf*EMP1	*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

PGE2/PGEM	Prostaglandine E2, Métabolites de la PGE2
p-i	post-infection
PO	Per os = voir orale
PPAR(γ)	Peroxisome Proliferator Activated Receptor (gamma)
PRR	Pattern Recognition Receptor = Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
RMCBS	Rapid Murine Cerebral Behaviour Scale
RNI	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SB	Score de Blantyre
SMA	Severe malarial anaemia = Anémie sévère palustre
SOD	Superoxide dismutase
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCR	Récepteur des Lymphocytes T
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TLR	Toll-Like Receptor
TGFβ	Facteur de croissance transformant bêta
TLR	Toll-Like Récepteurs
TNFα	Facteur de Nécrose Tumorale alpha
TPA	TetradecanoylPhorbol 13-Acetate
TPIg	Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse
TPIn	Traitement Préventif Intermittent du nourrisson
UM	Uncomplicated malaria = Accès palustre simple
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Facteur de Croissance de d'Endothélium Vasculaire
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSA	Antigènes Variants de Surface
WP	Work Package

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Incidence des cas de paludisme (nombre de cas / 1000 personnes à risque) dans le monde (source : WHO - Rapport sur le paludisme dans le monde 2019 (1))
Figure 2 : Forme sanguine, asexuée, de *P. falciparum* (source : Bannister *et al*, 2000)
Figure 3 : Anophèle femelle, moustique vecteur du paludisme (source : https://moustiques.fr)
Figure 4 : Cycle de vie de *P. falciparum* chez l'homme (A et B) et le moustique (C) (source : CDC)
Figure 5 : A) Globule rouge sain B) Globule rouge parasitée par *P. falciparum* (source : Rug *et al*, 2006)
Figure 6 : Frottis sanguin (à gauche) et goutte épaisse (à droite) (source : CIRAD)
Figure 7 : Principe d'un Test de Diagnostic Rapide (TDR) du paludisme (source : WHO - Bonnes Pratiques relatives au choix et à l'achat des tests de diagnostic rapide du paludisme, 2012)
Figure 8 : Algorithme de prise en charge lors d'une suspicion de paludisme (source : VIDAL)
Figure 9 : Activation des différentes sous-populations de LT CD4 au cours d'une infection palustre (source : Kumar *et al* 2020 (2))
Figure 10 : Lien entre immunité innée et acquise lors d'une infection palustre (source : Stevenson *et al* 2004 (3))
Figure 11 : Origine des différentes cellules hématopoïétiques (source : Soins-Infirmiers.com)
Figure 12 : La polarisation des monocytes en macrophages
Figure 13 : Mécanismes généraux conduisant à la production de ROS et de RNI au cours d'une infection palustre (source : Pereira *et al* 2020 (4))
Figure 14 : Principales fonctions des monocytes/macrophages au cours d'une infection palustre
Figure 15 : Principaux mécanismes physiopathologiques conduisant au développement du neuropaludisme
Figure 16 : Séparation des PBMC par centrifugation en gradient de densité (source : Ruber *et al* 2015)
Figure 17 : Modèle d'étude de la cinétique du paludisme cérébral murin et de sa résolution par un traitement tardif des souris à la CQ

Figure 18 : Suivi quotidien de la parasitémie (A), du poids (B) et du score neurologique (C) des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* et traitées (bleu) ou non (rouge) tardivement à la chloroquine
Figure 19 : Effets *in vitro* de la chloroquine sur les niveaux d'expression des gènes *Nrf2, PPARγ, CD36, HMOX1, HIF-1α* et *NQO1* sur les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 activés par la présence de globules rouges sains ou infectés par *P. berghei ANKA*.
Figure 20 : Stratégie de gating des sous-populations monocytaires et de la microglie dans le sang périphérique (A), la rate (B) et le cerveau (C) des souris par cytométrie en flux
Figure 21 : Evolution des sous-populations monocytaires et de la microglie dans le sang périphérique (A), la rate (B) et le cerveau (C) des souris au cours de l'infection palustre et de sa résolution (traitement tardif par la chloroquine)
Figure 22 : Evolution des intensités de fluorescence médianes (MFI) des marqueurs CD36, CD163 et CMH-II à la surface des sous-populations monocytaires et de la microglie dans le sang périphérique (A), la rate (B) et le cerveau (C) des souris au cours de l'infection palustre et de son traitement (traitement tardif à la chloroquine)
Figure 23 : Stratégie de gating des sous-populations monocytaires et de la microglie dans le cerveau et le sang périphérique des souris à J0, J7 et J12
Figure 24 : Niveaux d'expression des gènes *Nrf2, CD36, HMOX1, HIF-1α, COX-2* et *ALOX15* par les sous-populations monocytaires dans le sang périphérique et par la microglie des souris infectées par *P. berghei ANKA* et traitées tardivement à la chloroquine (J7-T et J12-T)
Figure 25 : Concentrations de différentes cytokines pro/anti-inflammatoires (A) et chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites d'inflammation (B) et dans le recrutement des LTh2, LT régulateurs et neutrophiles (C) à la fois dans le plasma (à gauche) et les cerveaux (à droite) de souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* et traitées ou non par la chloroquine (J0, J7 non traitées et J7 traitées)
Figure 26 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus au cours de la cinétique d'infection dans un modèle murin de paludisme cérébral et de sa résolution par un traitement tardif à la chloroquine, dans le sang, la rate et le cerveau des souris
Figure 27 : Diagramme de flux de l'étude NEUROCM (2018, Bénin)
Figure 28 : Fonds d'œil d'enfants atteints de neuropaludisme issus de l'étude NEUROCM. A gauche : fond d'œil normal. A droite : fond d'œil anormal avec de multiples hémorragies rétiniennes

Figure 29 : Stratégie de gating des sous-populations monocytaires dans le sang périphérique des patients NEUROCM par cytométrie en flux selon le protocole décrit par Marimuthu *et al* (5))

Figure 30 : Evolution des sous-populations monocytaires dans le sang périphérique des patients UM à J0 et CM à J0-J3-J21

Figure 31 : Evolution des intensités de fluorescence médianes (MFI) des marqueurs CD14, CD16, HLA-DR, CCR2, CX3CR1, CD36 et CD163 à la surface des 3 sous-populations monocytaires dans le sang périphérique des patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM).

Figure 32 : Niveaux d'expression des gènes *Nrf2*, *PPARγ*, *HMOX1*, *CD36*, *CD163*, *HIF-1α*, *COX-2*, *ALOX15*, *NOX2* et *NCF1* chez les sous-populations monocytaires dans le sang périphérique des patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM)

Figure 33 : A gauche : Aires sous les courbes des rapports entre la production induite de ROS sur la production basale par les monocytes des patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM). A droite : Corrélations entre le rapport production induite de ROS / production basale par les monocytes et les pourcentages des sous-populations monocytaires des patients NEUROCM

Figure 34 : Concentrations de différents marqueurs pro/anti-inflammatoires présents dans le plasmas des patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM) : cytokines (A), chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites d'inflammation (B), chimiokines impliquées dans le recrutement des LTh2, LT régulateurs et neutrophiles (C), et autres marqueurs d'intérêt (D)

Figure 35 : Concentrations urinaires de différents marqueurs pro/anti-inflammatoires et oxydants chez les patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales molécules antipaludiques actuellement recommandées par l'OMS

Tableau 2 : Médicaments utilisés en chimioprophylaxie du paludisme chez l'adulte et l'enfant (source : santepubliquefrance, BHE 2019 (6))

Tableau 3a : Les principales cytokines impliquées dans le neuropaludisme

Tableau 3b : Les principales chimiokines impliquées dans le neuropaludisme

Tableau 4 : Les trois sous-populations de monocytes chez l'homme et leurs principales caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles

Tableau 5 : Les différentes populations cellulaires étudiées et les anticorps utilisés pour leurs identifications par cytométrie en flux (Panel 1)

Tableau 6 : Données sociales et clinico-biologiques des trois groupes de patients présentant un paludisme simple (UM), une anémie sévère palustre (SMA) ou un neuropaludisme (CM), Bénin 2016

Tableau 7a : Etude de la répartition des différentes populations cellulaires par cytométrie en flux en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

Tableau 7b : Etude de l'activation des LT CD8 par cytométrie en flux, en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

Tableau 8 : Marqueurs analysés sur les PBMC issus du sang périphérique, du cerveau et de la rate des souris par cytométrie en flux

Tableau 9 : Séquences d'amorces murines utilisées en RT-qPCR

Tableau 10 : Marqueurs analysés sur les PBMC issus du sang périphérique des patients NEUROCM par cytométrie en flux

Tableau 11 : Séquences d'amorces humaines utilisées en RT-qPCR sur les échantillons NEUROCM, 2018

Tableau 12 : Données socio-démographiques des patients de l'étude NEUROCM (2018, Bénin)

Tableau 13 : Données déclaratives sur le parcours clinique et les symptômes cliniques précédant l'inclusion des patients dans l'étude NEUROCM (2018, Bénin)

Tableau 14 : Données cliniques à l'inclusion des patients de l'étude NEUROCM (2018, Bénin)

Tableau 15 : Données biologiques à l'inclusion (J0) des patients de l'étude NEUROCM (2018, Bénin)

Tableau 16 : Corrélations entre les parasitémies et les pourcentages des sous-populations monocytaires présentes dans le sang périphérique des patients UM et CM à J0
Tableau 17 a et b : Corrélations entre les concentrations plasmatiques de différents marqueurs des réponses pro- et anti-inflammatoires et les parasitémies et pourcentages des sous-populations monocytaires des patients NEUROCM
Tableau 18 a et b : Corrélations entre les concentrations urinaires de différents marqueurs des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes et les parasitémies et pourcentages des sous-populations monocytaires des patients NEUROCM

ANNEXES

Annexe 1 : Article décrivant le protocole du projet NEUROCM (Joste *et al*, 2019 (7))
Annexe 2 : Autres travaux en collaboration menés pendant ma thèse

INTRODUCTION GENERALE

Le paludisme, ou malaria, est la parasitose la plus répandue à travers le monde et constitue encore en 2021 un problème majeur de santé publique (8)*. Cette maladie est due à un parasite du genre *Plasmodium* dont cinq espèces infectent l'homme (*falciparum, malariae, ovale, vivax* et *knowlesi*). L'agent pathogène se transmet à l'homme *via* des piqures de moustiques infectés, les anophèles femelles (9). L'infection à *P. falciparum* est la plus commune et la plus dangereuse, pouvant conduire à un paludisme grave qui se décline en diverses pathologies, dont les plus fréquentes sont le neuropaludisme (ou paludisme cérébral) et l'anémie sévère palustre. Même correctement traitées, ces infections peuvent conduire à des séquelles neurologiques ou au décès du patient (10). Malgré les progrès considérables effectués au cours de la dernière décennie dans la lutte contre *Plasmodium*, l'OMS enregistre encore plus de 200 millions de cas et 400 000 décès dus au paludisme chaque année (11). L'Afrique sub-saharienne paie le plus lourd tribut en comptabilisant plus de 94% des cas principalement chez les enfants de moins de 5 ans. La prise en charge du paludisme grave repose sur des traitements efficaces à base d'artémisinine. Cependant, *P. falciparum* a su développer des mécanismes de résistance à l'arsenal de molécules antipaludiques disponibles (8). L'émergence de résistance à l'artémisinine et ses dérivés en Asie du sud-est rend la situation actuelle critique. Il est donc urgent de chercher de nouvelles approches thérapeutiques en particulier contre les formes graves de la maladie, ce qui nécessite une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de ces différentes formes cliniques.

Ma thèse s'articulera en deux parties. Dans la première partie, je présenterai tout d'abord les généralités sur l'infection palustre en me focalisant sur le neuropaludisme. Puis je m'attarderai sur la physiopathologie et les mécanismes de défense de l'hôte mis en œuvre au cours de l'infection. Je développerai ainsi le rôle central qu'occupent les monocytes, cellules clés du système immunitaire à l'interface entre les réponses innée et acquise. Les monocytes sont composés de trois sous-populations dont le rôle dans la physiopathologie du neuropaludisme a été peu étudié et reste à éclaircir. Dans la seconde partie de cette thèse je présenterai mes différents travaux de recherche dont le but était d'identifier des facteurs immunitaires impliqués dans la neuroinflammation et sa résolution au cours d'un paludisme cérébral. L'implication des différentes sous-populations monocytaires dans la pathologie palustre a été étudiée par une approche combinant modèle murin expérimental de paludisme

cérébral et deux études chez des enfants béninois atteints de différentes formes cliniques de paludisme.

* Pour une lecture facilitée des références en fin de document, ces dernières ont été numérotées et listées par ordre alphabétique, d'où une numérotation dans le document qui ne suit pas un ordre croissant.

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

« Moustique n'aime pas amusement où on applaudit ». Proverbe ivoirien

I – LE PALUDISME A PLASMODIUM FALCIPARUM

I-1. Le paludisme à travers l'histoire

Le paludisme, ou malaria, semble être une malade aussi vieille que le monde. Elle aurait influencé de façon majeure le cours du temps, de la préhistoire jusqu'au XXIème siècle, infectant tous les continents sauf l'Antarctique. Les premières traces d'ancêtres parasitaires palustres ont été retrouvées conservées dans de l'ambre datant du Crétacé, soit il y a environ 100 millions d'années (12). Des espèces plus récentes, comme *Plasmodium dominicana*, ont été observées dans des fossiles de moustiques conservés dans l'ambre datant de la période Tertiaire, c'est à dire il y a quelques dizaines de millions d'années (13).

L'origine et l'évolution de *Plasmodium falciparum,* agent principalement responsable du paludisme grave chez l'homme est encore un sujet de débats. Des études génomiques récentes ont prouvé qu'il est dérivé d'un sous-genre de parasites appelé *Laverania*, infectant les grands singes d'Afrique. L'analyse de son ancêtre le plus proche, *P. praefalciparum,* parasite infectant les gorilles, indique que *P. falciparum* aurait émergé chez l'homme il y a environ 40 à 60 000 ans (14, 15).

La première trace d'ADN de *P. falciparum* a été découverte sur des momies égyptiennes datant de moins 3000 ans avant Jésus Christ, et notamment sur celle de Toutankhamon (16). Durant l'Antiquité, les premiers signes cliniques (céphalée, fièvre, frisson) ont été décrits en Egypte dans le papyrus d'Ebers, et dans des manuscrits de médecine traditionnelle chinoise (17). Il faudra attendre le IVème siècle avant Jésus Christ, pour qu'Hippocrate précise ces signes cliniques dans « Le Livre des Epidémies » et « Consultations ». Il fait notamment allusion à des crises fébriles, de périodicités variables, qui seraient corrélées à la présence de marécages (18). C'est de cette observation que le nom de la maladie tire son origine : paludisme vient du latin *palus, paludis*, qui signifie « marais », et malaria (sa dénomination anglophone) de l'italien *mal-aria* ou « mauvais air ». L'apogée de l'empire romain et notamment les travaux d'assainissement ont permis de faire reculer le paludisme en Europe. Il réapparaitra quelques siècles plus tard lors de la chute de l'Empire romain. Durant le Moyen-âge, le paludisme s'étend de l'Espagne à la Russie, sans oublier la France où il persistera

jusqu'au milieu du XXème siècle. Les Grandes Découvertes et la traite négrière lui ont permis de s'installer sur le continent américain dès le XVIème siècle après Jésus Christ.

En 1880, le médecin militaire français Charles Alphonse Laveran identifia dans le sang des patients fébriles un parasite qu'il nomme *Haemamoeba malariae* (19). Il reçut le prix Nobel de médecine en 1907 pour l'ensemble de ses travaux. Durant l'année 1885, Marchiafava et Celli, deux chercheurs italiens, confirmeront la découverte de Laveran et nommeront ce parasite *Plasmodium*, puis décriront en 1889 le parasite responsable des formes sévères chez l'homme : *Plasmodium falciparum*. Il faudra cependant attendre le début du XXème siècle pour que les autres espèces de *Plasmodium* capables d'infecter l'homme (*P. vivax, ovale, malariae*) soient décrites et 2004 pour qu'une cinquième espèce responsable d'infections humaines soit reconnue, *P. knowlesi*, parasite jusqu'alors observé chez le singe.

En 1884, le docteur Patrick Manson émet l'hypothèse que la transmission du parasite à l'homme se fait par le moustique. Le rôle exact de l'anophèle femelle comme vecteur du paludisme ne sera identifié qu'en 1897 par son élève, le médecin anglais Sir Ronald Ross qui reçut le prix Nobel de médecine en 1902 (20). Deux ans plus tard, trois chercheurs italiens, Grassi, Bastianelli et Bignami décriront le cycle de *Plasmodium* chez le moustique. La culture *in vitro* de *P. falciparum* ne sera mise au point qu'en 1976 par W. Trager et J.B. Jensen, étape clé pour la recherche parasitaire et pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (21). Le cycle complet du parasite ne sera quant à lui expliqué que dans les années 1980.

Les premiers traitements à base d'écorce de Quinquina ont été découverts par Don Franscisco Lopez en 1630 lors de la conquête du Nouveau Monde. Ces traitements étaient déjà utilisés en Amérique du Sud par les indiens pour traiter les fièvres. Il faudra attendre 1820 pour que les pharmaciens J. Pelletier et J.B. Caventou réussissent à isoler la quinine, le principe actif de la plante. Au milieu du XXème siècle sont développés les antipaludiques de synthèse comme la chloroquine ainsi que de nouvelles stratégies de lutte antivectorielle avec l'utilisation d'insecticides comme le DDT (Dichloro Diphényl Trichloro-éthane). Malheureusement, seulement quelques années plus tard apparaissent les premières résistances, du parasite aux traitements, et des moustiques aux insecticides. Il faudra attendre 1972 pour mettre en évidence les propriétés antipaludiques de l'artémisinine, molécule issue d'une plante chinoise appelée Qinghao (*Artemisia annua*). Au début du XXIème siècle, de nouveaux traitements sont mis en place : les CTA (Combinaisons Thérapeutiques à base d'Artémisinine), mais très rapidement de nouvelles résistances apparaissent en Asie.

Aujourd'hui, malgré des avancées scientifiques majeures, de nombreuses questions sont encore sans réponse. La recherche vaccinale n'est toujours pas aboutie et les parasites ont développé des mécanismes de résistance à tous les antipaludiques disponibles aujourd'hui. Les recherches sur le parasite et la réponse de l'hôte sont donc essentielles afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques du paludisme pour lutter plus efficacement contre cette maladie.

I-2. Impact mondial du paludisme

Le paludisme est un problème majeur de santé publique et fait partie des 3 maladies prioritaires de l'OMS avec le VIH/SIDA et la tuberculose. C'est la parasitose la plus répandue à travers le monde et plus d'un tiers de la population mondiale est actuellement exposée au risque de paludisme. En 2019, la prévence du paludisme dans le monde était estimée à 230 millions de cas, dont 410 000 décès majoritairement dus à *P. falciparum*. L'Afrique est la région du monde qui paye le plus lourd tribut au paludisme, regroupant plus de 82% des cas et 94% des décès (11).

Depuis plus de dix ans, grâce à l'utilisation de moustiquaires imprégnées, des Tests de Diagnostic Rapide (TDR) et du développement de nouveaux traitements dérivés de l'artémisinine, l'incidence mondiale du paludisme a diminué. En effet, entre 2010 et 2019, l'OMS estime qu'elle a été réduite de 70% en Asie du Sud-est et de plus de 20% en Afrique. Cependant cette baisse de l'incidence a considérablement ralenti et n'évolue plus depuis cinq ans. En Amérique du Sud, l'incidence du paludisme a même récemment augmenté (Figure 1) (1).

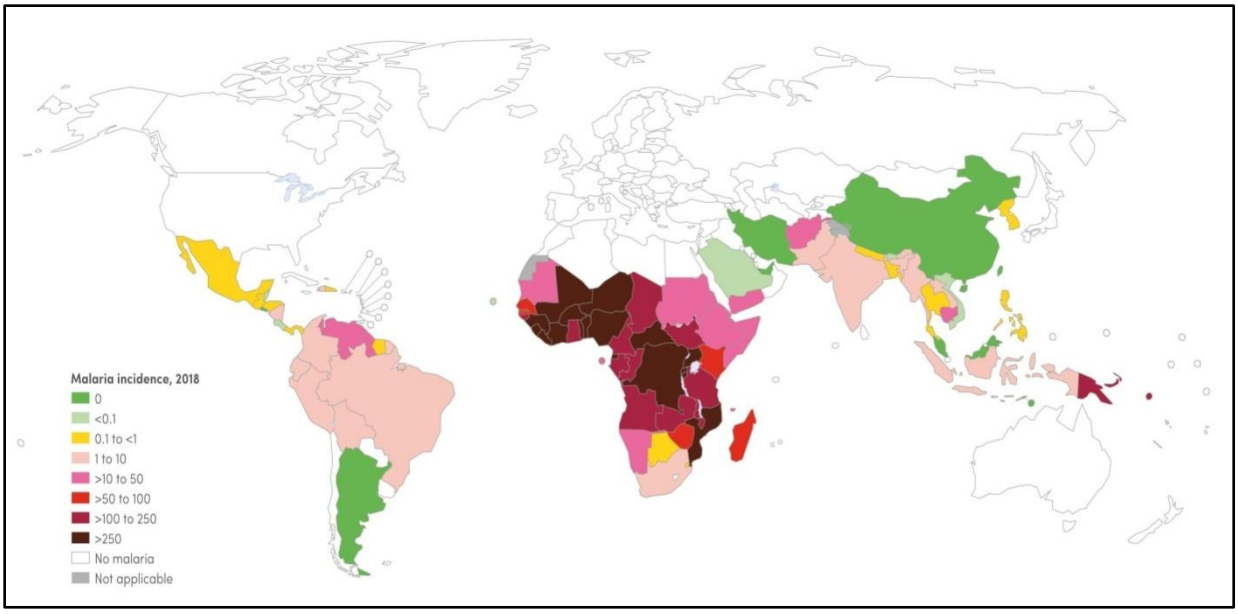


Figure 1 : Incidence des cas de paludisme (nombre de cas / 1000 personnes à risque) dans le monde (source : WHO - Rapport sur le paludisme dans le monde 2019 (1))

Le paludisme touche principalement les personnes les plus vulnérables :

- les femmes enceintes, surtout lors de leur première grossesse. Le paludisme peut alors être responsable d'anémies sévères et d'autres complications graves chez la mère pouvant conduire à des avortements spontanés ou à des bébés mort-nés. En 2019, l'OMS estime que 11,6 millions de femmes enceintes (soit un tiers des grossesses) ont été infectées par *P. falciparum* en Afrique sub-saharienne, alors que la mortalité due au paludisme grave durant la grossesse était d'environ 50% (11).
- les nourrissons, ayant un système immunitaire encore incompétent
- les enfants de moins de 5 ans. Ils représentent environ 70% des décès dus à *P. falciparum* (un enfant meurt du paludisme toutes les 5 minutes). En 2018, 24 millions d'enfants en Afrique sub-saharienne ont été touchés par le paludisme.
- les personnes immunodéprimées et notamment celles porteuses du VIH
- les migrants et les voyageurs en zone d'endémie n'ayant pas d'immunité spécifique contre les parasites du paludisme.

Les stratégies de prévention et de lutte contre le paludisme énoncées par l'OMS se multiplient (moustiquaires imprégnées d'insecticides, traitements préventifs, …) mais restent difficiles à mettre en place à grande échelle. Le paludisme impacte sensiblement le développement du pays dans lequel il sévit, ayant des conséquences sociales et économiques importantes. En effet, il touche majoritairement les classes sociales les plus défavorisées qui n'utilisent pas les

moyens de lutte adaptés pour se protéger des piqures de moustiques et qui ont des difficultés d'accès aux structures de soins. Début 2020, l'OMS estime encore que plus de 30% des enfants présentant une fièvre n'ont pas accès à une structure de soins leur permettant de bénéficier d'une prise en charge adéquate (11). De plus, les enfants ayant souffert de paludisme sévère ont plus de difficultés de scolarisation, de par l'absentéisme scolaire et les séquelles éventuelles. Pour les mêmes raisons, les adultes atteints de paludisme constituent un frein à la croissance économique de leur pays et limitent sa productivité.

L'Europe est la première région au monde qui est parvenue à éliminer le paludisme (22). Entre 1995 et 2015, le nombre de cas autochtones recensés est passé de 90 000 (principalement en Europe de l'Est) à zéro cas (23). Une surveillance accrue est encore en cours afin d'éviter une possible réintroduction du paludisme en Europe. Cependant, sous l'effet de la mondialisation et de la multiplication des échanges internationaux, des cas de paludismes d'importation ou d'aéroport sont toujours constatés.

En France, le paludisme a disparu depuis 1930 en métropole et depuis 1970 en Corse. On dénombre cependant encore des cas de paludisme d'importation, et la France est actuellement le premier pays européen touché par ce mode de transmission. Chaque année, environ 5000 cas sont pris en charge en France métropolitaine dont plus de 300 paludismes graves et moins d'une dizaine de cas mortels (6). La grande majorité des cas, principalement dus à *P. falciparum,* se développe chez des personnes originaires d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique Centrale. Le paludisme reste encore présent dans certains DOM-TOM et notamment en Guyane française et à Mayotte.

En 2020, la pandémie mondiale de COVID-19 a rajoutée une difficulté supplémentaire dans la lutte contre le paludisme. Mi-novembre, environ 22 millions de cas et 600 000 décès dus au COVID-19 ont été signalés dans les pays endémiques du paludisme. En dépit des efforts intenses mis en place pour surmonter cette crise, les perturbations dans le diagnostic et le traitement du paludisme sont évalués entre 5 et 50% dans l'ensemble des pays endémiques, entrainant, selon l'OMS, des dizaines de milliers de décès supplémentaires (11). « Alors que la COVID-19 continue à se propager rapidement, l'OMS tient à adresser un message clair aux pays d'Afrique touchés par le paludisme. Ne réduisez pas vos activités prévues pour la prévention, le diagnostic et le traitement du paludisme. Si une personne vivant dans une zone impaludée a de la fièvre, un diagnostic doit être posé et elle doit être prise en charge dès que possible. » P. Alonso, Directeur du programme mondial de lutte antipaludique de l'OMS, mars 2020.

I-3. Les acteurs

I-3.1) Le parasite

I-3.2.1/ Classification

Embranchement : *Apicomplexa*

Classe : *Sporozoea* (Sous-classe : *Coccidia*)

Ordre : *Eucoccidia* (Sous-ordre : *Haemosporina*)

Famille : *Plasmodidae*

Genre : *Plasmodium*

L'agent du paludisme, ou *Plasmodium,* est un protozoaire parasite, c'est-à-dire un organisme eucaryote unicellulaire, vivant à l'intérieur des cellules de l'homme (hépatocytes puis globules rouges). Pour pénétrer dans ces cellules, il est doté d'un complexe apical composé de différentes structures participant à l'invasion (rhoptries, granules denses, micronèmes) qui permettront de créer à l'intérieur du globule rouge (GR), la vacuole parasitophore, séparant le parasite du cytoplasme (Figure 2) (24). De plus, *Plasmodium* serait capable de sélectionner le GR le plus apte à l'accueillir en fonction de l'âge et de l'état du GR (25).

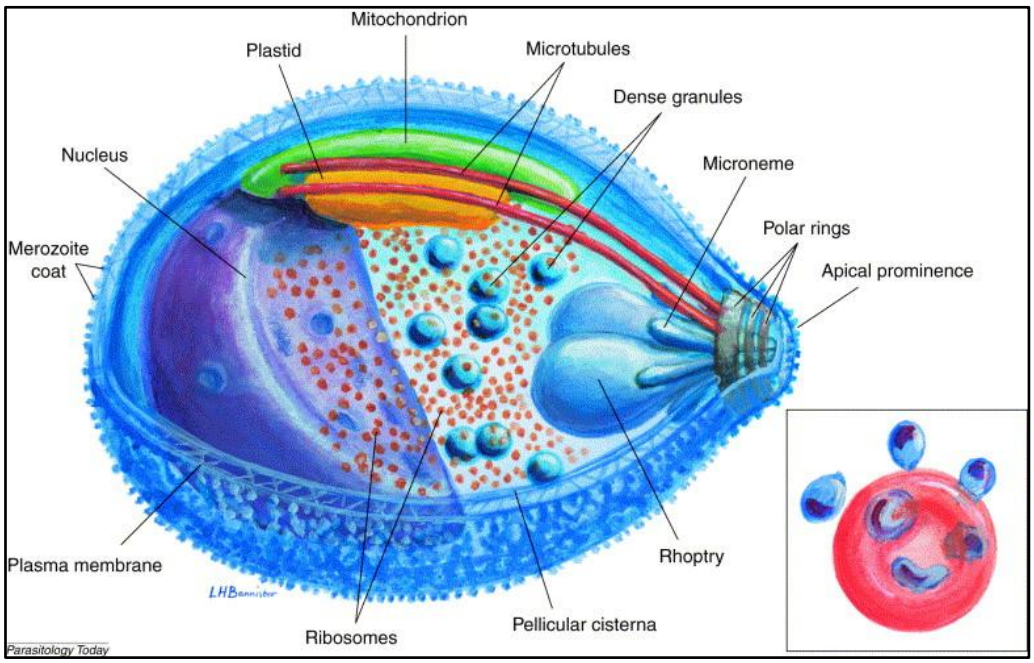


Figure 2 : Forme sanguine, asexuée, de *P. falciparum* (source : Bannister *et al*, 2000)

I-3.2.2/ Les différentes espèces de *Plasmodium*

Sur plus d'une centaine d'espèces de *Plasmodium* actuellement identifiées, cinq espèces sont capables d'infecter l'homme : *P. falciparum, vivax, ovale, malariae* et *knowlesi*. Certains patients peuvent être poly-parasités et donc être infectés simultanément par plusieurs espèces plasmodiales.

P. falciparum est l'espèce la plus largement répandue à travers le monde. Sa transmission est stoppée en dessous de 20°C, expliquant ainsi sa présence dans les zones tropicales et intertropicales (majoritairement en Afrique, mais également en Asie du Sud-est, dans la zone Méditerranéenne et dans le Pacifique) (1). *P. falciparum* infecte spécifiquement l'homme et est à l'origine de la grande majorité des paludismes graves et notamment du neuropaludisme. *P. falciparum* se distingue des autres espèces plasmodiales car il possède une propriété essentielle dans sa physiopathologie : la séquestration des GRi dans les différents tissus de l'organisme. L'importance de cette séquestration mais surtout sa localisation dans les tissus profonds et notamment le cerveau conditionnent le degré de sévérité de l'infection. Sa durée d'incubation est d'environ 7 à 12 jours, correspondant à la phase hépatique, asymptomatique chez l'homme. Puis l'invasion des GR se traduit par une fièvre tierce maligne liée à l'éclatement des GR suite à la multiplication des parasites. L'infection à *P. falciparum* évolue sans rechute. Son séquençage complet, réalisé en 2002, a permis d'identifier 14 chromosomes et plus de 5 500 gènes. De plus, *P. falciparum* est caractérisé par un polymorphisme génétique important (24). Les recombinaisons génétiques, les pressions immunitaires de l'hôte et de l'environnement sont à l'origine de la diversité génétique du parasite et de ses antigènes. Ce polymorphisme génétique et protéique constitue une stratégie du parasite pour éviter le système immunitaire de l'homme et développer des mécanismes de résistance aux antipaludiques.

P. vivax est une espèce ayant une répartition large (fréquemment retrouvé en Amérique latine, en Asie, et en Afrique du Nord) mais est quasi absente en Afrique noire. En effet, les GR Duffy négatifs, majoritairement retrouvés chez des individus vivants en Afrique sub-saharienne, sont dépourvus du récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax* (26). *P. ovale* est très proche de *P. vivax* mais sévit où ce dernier n'est pas, c'est-à-dire en Afrique noire. Il est également retrouvé dans quelques foyers en Asie du sud-est et dans certaines îles du Pacifique. Ces deux parasites sont strictement humains et sont responsables d'une fièvre tierce bénigne pouvant parfois évoluer en paludisme grave (27, 28). Leur durée

d'incubation est de 15 jours mais des cas de rechutes ont été décrits et peuvent apparaitre jusqu'à 4 ans après l'infection (29, 30).

P. malariae présente une répartition plus clairsemée mais mondiale. Son hôte habituel est l'homme mais il peut également toucher le singe. Il est responsable d'une fièvre quarte bénigne pouvant parfois entrainer des complications rénales (31). Sa durée d'incubation est de 2-3 semaines avec des rechutes possibles pouvant aller jusqu'à 20 ans après l'infection (32).

P. knowlesi sévit en Asie du Sud-est. Son hôte habituel est le singe macaque mais l'homme peut être occasionnellement infecté par ce parasite (33, 34). Le diagnostic d'une infection à *P. knowlesi* chez l'homme est difficile car le parasite est souvent confondu avec *P. malariae* ou *P. falciparum* (35). L'infection se manifeste par une fièvre quotidienne et des complications sévères peuvent apparaitre.

I-3.2) Le vecteur

Le paludisme est transmis à l'homme par l'intermédiaire d'un vecteur : l'anophèle femelle (Figure 3). Parmi plus de 400 espèces d'anophèles décrites dans la littérature, toutes ne sont pas capables de transmettre le paludisme (9). On en compte cependant une cinquantaine dont les principales sont *Anopheles gambiae*, en Afrique, *Anopheles darlingi* en Amérique du Sud et *Anopheles stephensi* en Asie.

Les anophèles se développent dans des zones chaudes et humides, expliquant ainsi l'importante prévalence du paludisme dans ces lieux. La femelle n'est fécondée qu'une seule fois par l'anophèle mâle. Leur reproduction se fait dans l'eau où la femelle va venir pondre ses œufs. Ce derniers se transformeront alors en larves aquatiques et, à la suite de 4 mues successives, en nymphes puis en anophèles adultes (36). La durée de vie d'un adulte est de seulement quelques semaines et dépend fortement des conditions environnementales, notamment de la température. Sa longévité aura ainsi des conséquences sur l'efficacité de la transmission du parasite et donc de la maladie. De plus, la surface d'action des anophèles ne dépasse pas deux kilomètres, expliquant les différences de prévalence du paludisme entre deux zones géographiquement proches (9).

Seule la femelle est hématophage. Elle pique l'homme et se nourrit de son sang pour la maturation de ses œufs. L'anophèle femelle pique le soir et la nuit, attirée par le CO_2, et le sébum dégagé par les hommes. Une seule piqûre infectante, silencieuse et indolore, suffit à transmettre le paludisme (36). Le moustique joue donc le rôle de vecteur de la maladie, et l'homme de réservoir du parasite.



Figure 3 : Anophèle femelle, moustique vecteur du paludisme (source : https://moustiques.fr)

I-3.3) Cycle de développement

Le cycle complet de développement de *Plasmodium* passe obligatoirement par deux hôtes :
1/ l'homme, hôte intermédiaire, où il effectue deux cycles asexués (ou schizogoniques) : la première phase est hépatique (exo-érythrocytaire), et la seconde sanguine (érythrocytaire)
2/ le moustique vecteur, hôte définitif, où il effectue son cycle sexué (ou sporogonique) (Figure 4).

I-3.3.1/ Cycle asexué chez l'homme

Le premier cycle hépatique est totalement asymptomatique. Il n'a lieu qu'une fois et dure 1 à 3 semaines selon l'espèce. Il débute au cours du repas sanguin de l'anophèle femelle. Le moustique parasité injecte à l'homme quelques dizaines de sporozoïtes (ou formes infestantes) qui migrent rapidement jusqu'au foie via la circulation sanguine. Durant cette courte période, les parasites sont visibles par le système immunitaire de l'hôte et peuvent donc être éliminés par des mécanismes de phagocytose. Une fois à l'intérieur des hépatocytes de l'homme, les parasites sont moins vulnérables et peuvent donc assurer leur multiplication et leur maturation. Dans le foie, les sporozoïtes deviennent des hépatozoïtes qui, après maturation se transforment en schizontes exo-érythrocytaires, appelés corps bleus (37). Après une phase de maturation et de multiplication, les cellules hépatocytaires vont éclater libérant ainsi dans la circulation sanguine des milliers de mérozoïtes.
Dans le cas de *P. vivax* et *ovale*, les parasites peuvent rester quiescents dans les hépatocytes, sous la forme d'hypnozoïtes, expliquant ainsi les phénomènes de rechute observés pour ces espèces et absents pour *P. falciparum* (38). Ce phénomène n'a jamais été observé pour *P. malariae* qui présente cependant des accès de reviviscence tardifs jusqu'à 20 ans après l'infection.

Le second cycle chez l'homme est un cycle sanguin pouvant s'effectuer plusieurs fois. Il dure 48h pour *P. falciparum*, *vivax* et *ovale*, et 72h pour *P. malariae*, ces périodicités correspondent aux différents pics fébriles observés lors des accès palustres. Le cycle débute par la pénétration par endocytose des mérozoïtes dans les GR. Ils évoluent rapidement en différentes phases : en anneau (ou bague à chaton), puis en trophozoïtes et en schizontes endo-érythrocytaires.

Pour se développer, le parasite utilise les ressources de l'hôte et la machinerie cellulaire du GR. En effet, il a la capacité de consommer et dégrader l'hémoglobine (Hb), et d'éliminer ses déchets toxiques en les transformant en cristaux d'hémozoïne, pigments malariques pyrogènes responsables des accès fébriles, formant des amas pigmentaires intracytoplasmiques (39). La membrane du GR infecté (GRi) est alors altérée. Sa morphologie et sa composition changent. De plus, le GRi par *P. falciparum* exprime à sa surface des protéines parasitaires appelées antigènes variants de surface (VSA), notamment la protéine *Pf*EMP1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) codée par une famille de 60 gènes *var* et localisée au niveau de protubérances appelées knobs (40, 41). Le GRi présente ainsi un contour irrégulier, plus antigénique et moins déformable (Figure 5). De par ses 60 gènes, *Pf*EMP1 présente une variabilité antigénique qui rend la tâche complexe à la réponse immune pour la production d'anticorps (Ac) spécifiques efficaces. Ces protéines parasitaires conditionnent la virulence du parasite et leur localisation dans les différents organes. Par exemple, lors d'un neuropaludisme, elles participent à la séquestration des hématies infectées dans les organes profonds et notamment le cerveau en interagissant avec les récepteurs membranaires des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins. Cette cytoadhérence permet aux GRi d'échapper au système immunitaire et à leur destruction dans la rate. Dans le cas du neuropaludisme, la cytoadhérence des GRi aux cellules endothéliales composants la barrière hémato-encéphalique (BHE) induit une obstruction du flux sanguin, et participe à la pathogénèse.

Après maturation et multiplication au sein des GRi, les parasites, sous forme de schizontes, se transforment en corps en rosace et font éclater les GRi induisant une hémolyse et la libération de plusieurs dizaines de mérozoïtes dans la circulation sanguine qui pourront ainsi infecter de nouvelles hématies. La destruction des GRi va également libérer de l'hémozoïne, des facteurs parasitaires, des glycoprotéines et glycolipides (GPI), etc… (37). Après un certain nombre de cycles ou suite à un stress, les parasites peuvent évoluer en gamétocytes mâle et femelle qui resteront dans la circulation sanguine dans le but d'être récupérés par un moustique sain lors de son repas sanguin.

Contrairement à *P. falciparum*, les gamétocytes de *P. vivax* sont rapidement retrouvés dans la circulation sanguine, avant même l'apparition des premiers symptômes accélérant donc la transmission palustre (42).

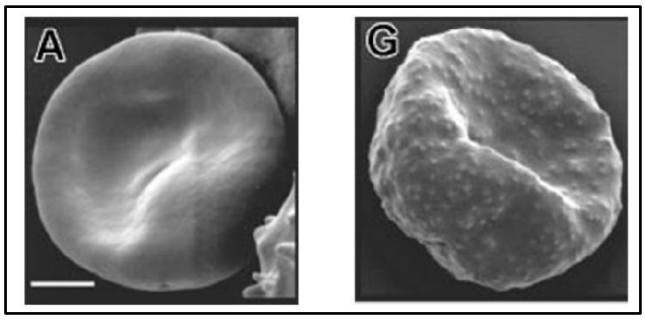


Figure 5 : A) Globule rouge sain B) Globule rouge parasitée par *P. falciparum* (source : Rug *et al,* 2006)

I-3.3.2/ Cycle sexué chez le moustique

Chez l'anophèle femelle, le cycle sexué du parasite dure entre 10 et 20 jours. Dans l'estomac du moustique, sous l'influence de la diminution de la température, d'une augmentation du pH et de la présence d'acide xanthurinique, les gamétocytes ingérés évoluent en gamètes mâle mobile et femelle qui vont fusionner pour donner un zygote puis un ookinète (petit œuf mobile) (37). Ce dernier passera par effraction l'épithélium de l'estomac et se transformera en oocyste (œuf immobile) après fixation dans la paroi externe de l'estomac du moustique, moins de 24h après son le repas sanguin. Après multiplication, l'oocyste évoluera en sporocyste contenant environ 10 000 sporozoïtes (formes infestantes) qui migreront jusqu'aux glandes salivaires du moustique dans l'attente d'un futur repas sanguin.

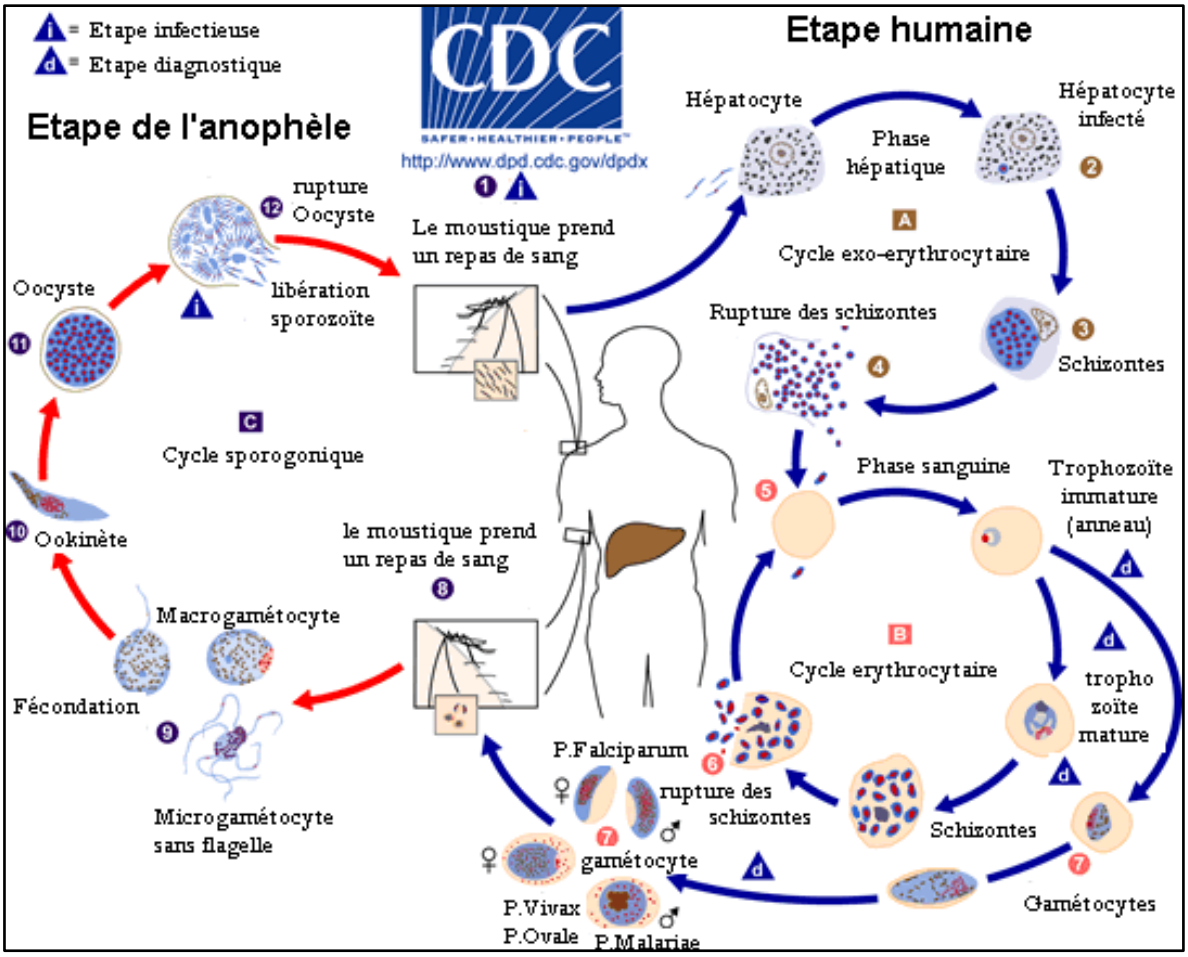


Figure 4 : Cycle de vie de *P. falciparum* chez l'homme (A et B) et le moustique (C) (source : CDC)

I-3.4) Les différents modes de transmission

I-3.4.1/ Contamination par le vecteur

L'intensité de la transmission dépend de facteurs parasitaires, de l'hôte, du vecteur mais également de l'environnement. La transmission est plus intense dans les zones où les moustiques vecteurs vivent plus longtemps, notamment grâce à un climat adapté (température, pourcentage d'humidité, pluies, faible altitude). En général, il n'y a peu de transmission dans les centres-villes des grandes agglomérations, la transmission sévissant plutôt en périphérie et dans les zones rurales. De plus, les caractéristiques génétiques et immunitaires des populations exposées au paludisme influencent fortement la transmission du parasite (enfants de moins de 5 ans, mouvement de populations non immunisées, spécificité génétique conférant aux individus un facteur de protection ou de gravité palustre, …).

* *Le paludisme autochtone :* C'est une infection contractée dans une zone d'endémicité palustre. Dans les zones hyperendémiques, le paludisme survient surtout chez les femmes enceintes, les enfants de 6 mois à 10 ans et les immunodéprimés. Les personnes vivant dans ces zones auront en effet développé, au bout d'une dizaine d'années, une réponse Ac spécifique de la population plasmodiale de la zone (43, 44).

* *Le paludisme d'importation :* Il correspond à une infection palustre observée hors zone d'endémie, chez une personne revenant d'une zone d'endémie. En France, le nombre de cas de paludisme d'importation s'élève à environ 5000 par an dont quelques centaines de paludismes graves. Il est donc impératif de diagnostiquer et traiter ces patients en urgence.

I-3.4.2/ Paludisme transfusionnel

Les cinq espèces de *Plasmodium* infectant l'homme peuvent être transmises lors d'une contamination par le sang : lors d'une transfusion, suite à un accident d'exposition au sang ou lors du partage de seringue chez les usagers de drogues par intraveineuse (IV). *Plasmodium* étant un parasite intra-érythrocytaire, sa viabilité dépend donc de celle des GR. Ainsi, le risque de transmission du paludisme existe uniquement lors d'une contamination à partir de sang frais avec des GR intacts. La conservation des poches de sang au réfrigérateur ne permet pas de tuer les parasites qui peuvent résister environ 2 semaines à 4°C (45). C'est pourquoi en France, la recherche du parasite est systématique pour chaque don de sang. Malheureusement, dans la plupart des pays où le paludisme est endémique, ce dépistage n'est pas réalisé, sous-évaluant l'impact de cette voie de contamination.

I-3.4.3/ Paludisme congénital ou transplacentaire

Durant la grossesse, les parasites peuvent être transmis d'une mère infectée à son fœtus *via* le sang du cordon. Cependant ce mode de transmission est rare car les Ac maternels protègent le nouveau-né, et les parasites transmis au nourrisson sont peu viables étant donné leur incapacité à digérer l'hémoglobine fœtale.

I-4. Tableaux cliniques et biologiques

Le cycle intra-hépatique du parasite correspond à la phase d'incubation et est cliniquement asymptomatique. C'est lors du cycle intra-érythrocytaire que les signes cliniques apparaissent.

I-4.1) Accès palustre simple

C'est la forme clinique la plus fréquente. Elle se définit par un diagnostic positif (voir les différents types de diagnostic, chapitre I-5.1-Diagnostic) et l'expression de manifestations cliniques palustres sans complications. Le tableau clinique est assez variable et non spécifique au paludisme.

Un paludisme simple débute par une forte fièvre pouvant dépasser 40°C et est souvent associé à un syndrome pseudo-grippal avec apparition de céphalées, myalgies, troubles digestifs (douleur abdominale, vomissement, diarrhée) (46). Une hépato-splénomégalie due à une forte activité phagocytaire est parfois observée, tout comme une coloration foncée des urines traduisant une hémoglobinurie. D'autres signes biologiques non spécifiques sont fréquemment rencontrés (anémie, thrombopénie, hémolyse, cytolyse hépatique, syndrome inflammatoire…).

Avec la synchronisation du cycle intra-érythrocytaire et l'éclatement des GRi, la fièvre initialement continue évolue et devient une fièvre périodique avec des pics fébriles. Ces pics sont caractérisés par l'enchaînement de différents symptômes qui sont généralement identiques chez un même malade : début brutal puis frisson (fièvre > 39°C, dure 1h), chaleur (fièvre > 40°C, dure 3-4h) et sueur et hypothermie (baisse de la température, dure 2-4h) puis euphorie. Selon les espèces de *Plasmodium,* la chronicité des pics fébriles n'est pas la même. En effet, on observe une fièvre tierce avec *P. falciparum, vivax* et *ovale* (cycle de 48h) et une fièvre quarte avec *P. malariae* (cycle de 72h). *P. knowlesi* présente quant à lui une fièvre quotidienne (cycle de 24h).

A ce stade de l'infection, les tableaux cliniques et biologiques sont non spécifiques et ne permettent pas de connaitre l'évolution de la pathologie, or la plupart des accès graves débutent par un accès simple qui évoluera vers des complications. Si elle n'est pas diagnostiquée rapidement et traitée correctement, une infection à *P. falciparum* évolue en infection mortelle, et un paludisme grave traité reste fatal dans environ 20 à 30% des cas (47). C'est pour cela que le diagnostic du paludisme est une urgence médicale : toute fièvre chez un patient de retour d'une zone d'endémie palustre doit faire suspecter un paludisme.

I-4.2) Accès palustres graves à *P. falciparum*

Les accès palustres graves, définis par la défaillance d'un organe vital ou par l'infection du placenta, sont majoritairement dus à *P. falciparum*. Quelques cas de paludisme sévère à *P. vivax* et *P. knowlesi* ont néanmoins été observés (33, 34). Une infection palustre provoquée par *P. ovale* ou *P. malariae* peut causer des complications sévères mais met rarement en danger la vie des patients. La survenue d'accès palustres graves peut s'expliquer par différents facteurs : 1/ liés à l'homme (âge, origine, génétique, immunité, co-infection…), 2/ liés au vecteur 3/ liés au parasite 4/ environnementaux, 4/ socio-économiques.

L'OMS a défini les critères précis du paludisme grave, servant de base aux recherches épidémiologiques. Par définition, un paludisme grave non placentaire est caractérisé par la présence de formes parasitaires asexuées et la présence d'un ou plusieurs des critères suivants (10, 28) :

- Troubles de la conscience : score de Glasgow < 11 (chez l'adulte) et un score de Blantyre (SB) < 3 (chez l'enfant)
- Défaillance neurologique (obnubilation, confusion, somnolence, prostration)
- Convulsions répétées (> 2 épisodes en 24h)
- Défaillance respiratoire
- Acidose (bicarbonate plasmatique < 15 mmol/l ou acidémie avec pH < 7,35)
- Hyperlactatémie (lactate > 5 mmol/l)
- Hypoglycémie (glucose sanguin ou plasmatique < 2,2 mmol/l)
- Anémie sévère : Hb ≤ 5 g/dl ou un hématocrite ≤ 15% chez l'enfant de moins de 12 ans et une Hb ≤ 7 g/dl ou un hématocrite ≤ 20% chez l'adulte, avec une densité parasitaire (DP) > 10 000/µl de sang
- Lésion rénale aiguë : créatinine plasmatique ou sérique > 265 µmol/l ou urée sanguine > 20 mmol/l
- Hémoglobinurie
- Ictère : bilirubine plasmatique ou sérique > 50 µmol/l avec une DP > 100 000/µl de sang
- Anomalies hémorragiques
- Collapsus circulatoire ou choc, tension artérielle systolique < 80 mm Hg chez l'adulte et < 50 mm Hg chez l'enfant
- Hyperparasitémie : parasitémie à *P. falciparum* > 10% (environ 400 000/µl de sang)

Le lien entre la densité parasitaire (DP) et le devenir clinique du patient diffère en fonction des zones de transmission palustre. En effet, dans les zones de faible transmission, la mortalité augmente pour des parasitémies supérieures à 2,5% (soit une DP > 100 000/µl) alors que ce seuil est beaucoup plus élevé dans les zones de forte transmission où une meilleure tolérance du parasite est observée. Une parasitémie > 20% est dans tous les cas considérée comme un facteur de risque de décès.

I-4.2.1/ Neuropaludisme

Cette forme clinique est uniquement due à *P. falciparum* et touche principalement les enfants de moins de 5 ans. Selon les individus, elle peut débuter de façon progressive ou brutale et est caractérisée par l'apparition d'une forte fièvre (jusqu'à 41°C), des convulsions, des troubles neurologiques (hypotonie), des troubles de la conscience (coma), potentiellement associés à des manifestations viscérales (hépato-splénomégalie) et à une détresse respiratoire. D'autres signes biologiques peuvent être mis en évidence tels qu'une anémie, une hémolyse, une thrombopénie, parfois une hyperleucocytose et une neutropénie. L'évolution du neuropaludisme dépend de la rapidité du diagnostic et de la prise en charge du patient. Malgré un traitement efficace, il peut conduire à des séquelles neurologiques dans 4 à 10 % des cas ou au décès du patient en 2 ou 3 jours dans environ 20% des cas (47).

I-4.2.2/ Autres formes de paludismes graves

* *L'anémie sévère palustre :* Elle est définie par un taux d'Hb < 5g/dl ou un hématocrite < 15%. Elle est souvent rencontrée lors d'un neuropaludisme et peut être associée à des états de confusion, d'agitation et à une acidose métabolique. Elle est corrélée à de fortes DP.

* *La détresse respiratoire (acidose métabolique) :* Elle est caractérisée par une respiration profonde avec tirage intercostal dans la partie inférieure de la cage thoracique. Elle est souvent associée au neuropaludisme ou à une anémie sévère.

* *L'hypoglycémie (glycémie < 2,2 mmol/l) :* Elle est souvent observée chez les enfants malnutris, dans le coma ou présentant une acidose métabolique. Chez l'adulte elle peut résulter de la prise de quinine qui induit une hyper-insulinémie.

* *Fièvre bilieuse hémoglobinurique :* Rare et causée par *P. falciparum,* elle est la conséquence d'une mauvaise prise de quinine et conduit à une hémolyse intravasculaire brutale et donc à une anémie profonde. Elle est caractérisée par un état de prostration et des

lombalgies, associés à une forte fièvre, un ictère hémolytique, une forte hémoglobinurie puis à une anurie (blocage rénal). Les conséquences peuvent être dramatiques avec un coma et une insuffisance rénale conduisant au décès du patient dans environ 30% des cas.

* *Paludisme de la femme enceinte (paludisme placentaire ou gestationnel) :* Que la femme présente ou non des symptômes de gravité, cette forme clinique est considérée grave, étant donné le risque encouru pour la mère et l'enfant (48). Les conséquences les plus fréquentes sont une anémie sévère chez la mère pendant la grossesse (associée à un risque accru d'hémorragie lors de l'accouchement et donc à l'augmentation de la mortalité périnatale) et un faible poids à la naissance du nouveau-né. Une hypoglycémie et un œdème pulmonaire sont des signes récurrents, de même que l'augmentation des risques de co-infections et de complications obstétricales. Une surveillance étroite est recommandée pour éviter toute aggravation clinique. La séquestration massive de *P. falciparum* dans le placenta, due à son affinité pour le récepteur placentaire chondroïtine sulfate A (CSA), pourrait considérablement affecter les échanges entre la mère et le fœtus, et expliquer la fréquence des faibles poids de naissance au sein des enfants nés de mères infectées (49). La mortalité due au paludisme durant la grossesse est d'environ 50%. Les femmes primipares ont plus de risque de développer un paludisme que les multipares.

I-5. Diagnostics et traitements

I-5.1) Diagnostics

La période d'incubation de la maladie, cliniquement asymptomatique, correspond au cycle hépatique du parasite chez l'homme. Le diagnostic est donc lié au cycle intra-érythrocytaire et à l'apparition des premières manifestations cliniques. Un diagnostic rapide est essentiel pour une prise en charge efficace du patient et ainsi éviter l'aggravation des cas de paludisme et les décès associés.

I-5.1.1/ Diagnostic de présomption

* *Interrogatoire du patient :* La première étape du diagnostic est d'identifier si le patient a séjourné en zone d'endémicité palustre. L'identification de la zone géographique permet de mieux cibler l'espèce plasmodiale potentiellement mise en cause et de procéder à une prise en charge adaptée au patient.

* *Examens clinique et biologique (NFS) :* Le tableau clinique du paludisme n'est pas spécifique de cette maladie et s'apparente à beaucoup d'autres pathologies (grippe, infection du système nerveux, méningite, septicémie, pneumonie, autres parasitoses, …). Le diagnostic clinique est donc assez difficile et nécessite de prendre en compte l'ensemble des potentiels diagnostics différentiels. Bien que peu spécifiques, différents signes biologiques peuvent orienter le diagnostic vers une infection palustre : 1/ une anémie progressive et une hémoglobinurie, apparaissant lors de la synchronisation du cycle avec l'éclatement simultané des GRi, 2/ une thrombocytopénie traduisant une séquestration des plaquettes dans les capillaires sanguins, 3/ une leucocytose, 4/ un syndrome inflammatoire correspondant à une augmentation de la Protéine C-Réactive.

I-5.1.2/ Diagnostic de certitude

Aucun élément des tableaux clinique et biologique n'est spécifique de l'infection palustre. Il est donc nécessaire d'effectuer au plus vite un diagnostic de certitude. Ce dernier consiste à identifier la présence des différentes formes parasitaires durant la phase intra-érythrocytaire par prélèvement sanguin.

* *Examen microscopique conventionnel :* C'est la technique de référence pour le diagnostic du paludisme. Il existe deux méthodes complémentaires : le frottis sanguin (FS) et la goutte épaisse (GE) (Figure 6). Ces deux méthodes nécessitent les compétences d'un biologiste qualifié et la présence de matériel adéquat (microscope, lame, produit de coloration). Si le diagnostic s'avère négatif, la lecture doit être répétée afin de limiter les faux négatifs. La surveillance de la densité parasitaire (DP) en début de traitement est essentielle afin d'évaluer l'efficacité du médicament antipaludique administré et identifier de potentielles résistances.
Le frottis mince consiste à étaler une goutte de sang et de la colorer au May Grümwald Giemsa (MGG). Elle permet de mesurer la DP du patient et a l'avantage de pouvoir établir un diagnostic d'espèce. La goutte épaisse est une technique de micro-concentration qui permet l'identification du parasite même en cas de faible parasitémie.

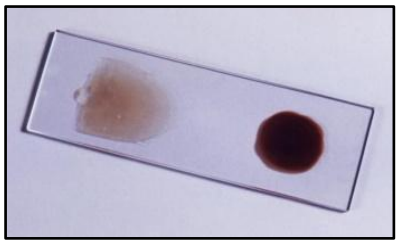


Figure 6 : Frottis sanguin (à gauche) et goutte épaisse (à droite) (source : CIRAD)

* *Test de diagnostic rapide (TDR) :* Faciles à réaliser, rapides et fiables, ces tests recherchent la présence d'antigènes plasmodiaux circulants et sont donc sont effectués en complément de la mise en évidence directe des parasites et leur comptage sur FS/GE. Ils ne sont pas utilisés pour surveiller et évaluer l'efficacité du traitement administré au patient car ils peuvent se révéler positifs jusqu'à 4 semaines après l'élimination des parasites. Les TDR utilisent une technique d'immunochromatographie : ils sont réalisés sur bandelette à l'aide d'un Ac monoclonal (Figure 7). Dans la majorité des cas, les TDR visent l'antigène HRP-2 (Histidin-Rich-Protein 2) spécifique de *P. falciparum* qui a la propriété de disparaitre lentement de l'organisme. D'autres TDR ciblent des enzymes parasitaires, ou d'autres protéines plasmodiales telles que la pLDH (*Plasmodium* lactate deshydrogenase) ou l'aldolase. La majorité des TDR diagnostiquent spécifiquement *P. falciparum*, mais il existe des TDR dits « pan-spécifiques » capables de diagnostiquer plusieurs espèces de *Plasmodium*.

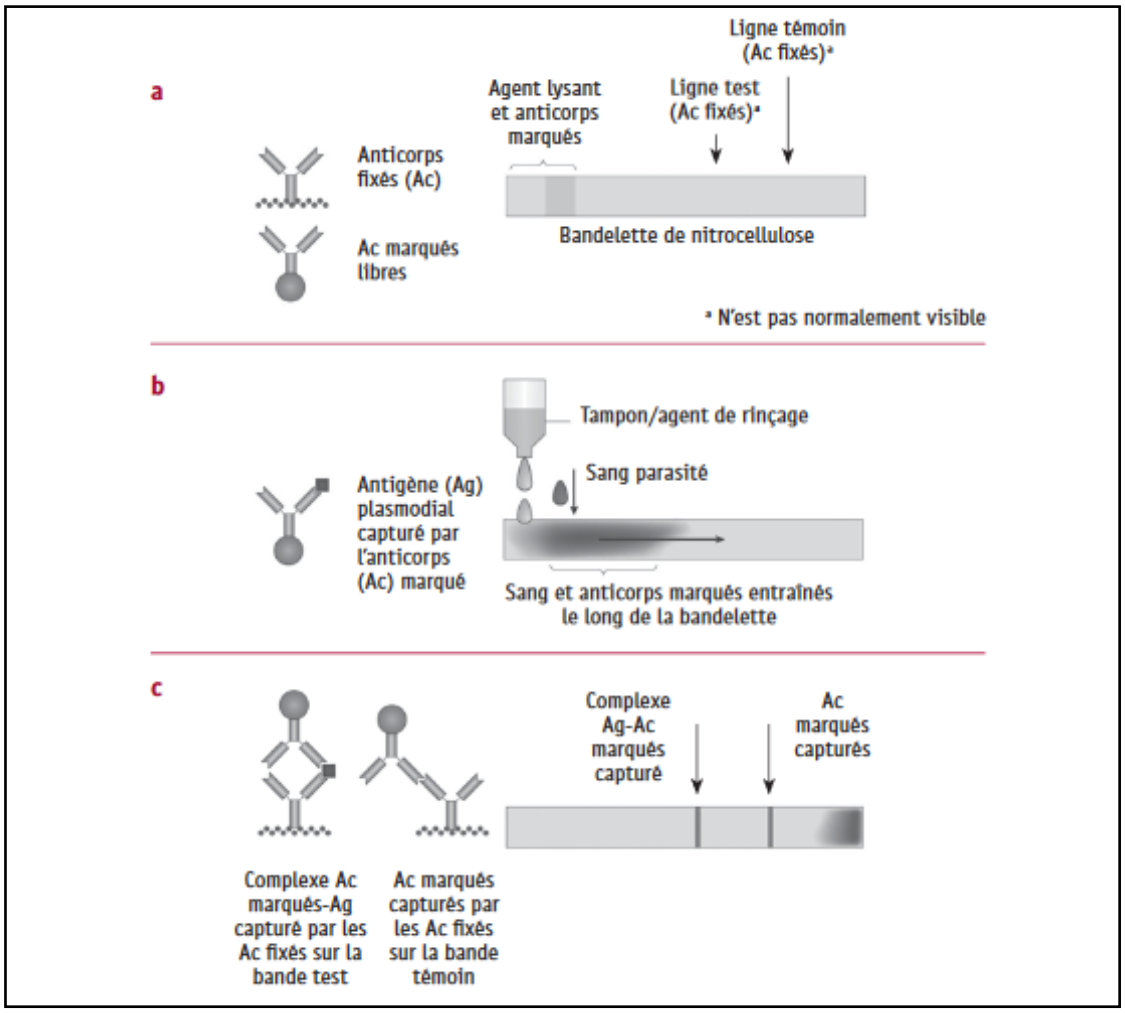


Figure 7 : Principe d'un Test de Diagnostic Rapide (TDR) du paludisme (source : WHO - Bonnes Pratiques relatives au choix et à l'achat des tests de diagnostic rapide du paludisme, 2012)

* *Le malaria-test QBC (Quantitative buffy-coat) :* Dans un capillaire, l'ADN du parasite est concentré puis coloré à l'aide d'un colorant fluorescent, l'acridine orange. Bien que très rapide et sensible, cette autre technique de microscopie nécessite un équipement particulier moins adapté au diagnostic de routine dans les pays à faible revenus.

* *PCR (Polymerase Chain Reaction) :* Cette technique d'amplification génique a l'avantage de présenter de très fortes sensibilité et spécificité permettant la détection de *Plasmodium* mêmes lors de très faibles parasitémies. Elle est particulièrement utile pour évaluer les résistances et pour des recherches épidémiologiques mais n'est pas effectuée en routine dans les pays endémiques pour le diagnostic d'urgence car son délai de réalisation est trop long et coûteux.

* *Sérologie :* Cette technique immuno-enzymatique permet la détection du complexe Ag-Ac formé par une réaction enzymatique impliquant un second Ac anti-immunoglobuline humaine couplé à un fluorochrome. Le diagnostic sérologique n'est pas réalisé en urgence car l'identification d'Ac chez le patient ne traduit pas forcément une infection actuelle mais souligne un contact préalable avec le parasite. Il est principalement réalisé afin de diagnostiquer de façon rétrospective une infection palustre et de prévenir les cas de paludisme transfusionnel par le contrôle des poches de sang.

I-5.2) Traitements

La prise en charge en ambulatoire constitue la majorité des cas en zone d'endémie, les accès simples étant très fréquents. L'apparition de symptômes de gravité nécessite en revanche l'hospitalisation du patient.

I-5.2.1/ Les principaux antipaludiques et leurs cibles

Le tableau 1 présente les principaux médicaments antipaludiques actuellement recommandés par l'OMS. Ces derniers peuvent être classés en fonction de leur origine (antipaludiques naturels tels que la quinine ou l'artémisinine, ou issus d'une synthèse chimique), mais aussi en fonction de leur cible et leur mécanisme d'action. Ces médicaments peuvent être utilisés en préventif ou en curatif et doivent tous être délivrés sur prescription médicale. Ils sont à prendre pour la grande majorité au cours du repas ou avec une boisson lactée afin d'améliorer leur biodisponibilité.

* Les schizonticides érythrocytaires :

Ce groupe est composé de différentes classes médicamenteuses agissant toutes à l'intérieur du GR, lors la digestion de l'Hb par le parasite.

- *Les amino-4-quinoléines (chloroquine, amodiaquine, pipéraquine) et les aryl-amino-alcool (quinine, méfloquine, luméfantrine) :* Agissent en inhibant la détoxification de l'hème de l'Hb, conduisant à une accumulation d'hématine, produit de dégradation de l'hème toxique pour le parasite (50, 51).

- *Les dérivés de l'artémisinine (artéméther, artésunate, dihydro-artémisinine ou DHA métabolite actif de l'artésunate et de l'artéméther) :* Ces médicaments jouent sur la libération de radicaux libres toxiques pour le parasite. Ils agissent contre tous les stades parasitaires intra-érythrocytaires mais également sur les gamétocytes permettant alors de limiter la transmission des parasites chez le moustique.

- *Les antifolates, comprenant les antifoliques (sulfadoxine) et antifoliniques (pyriméthamine, proguanil) :* Agissent sur la voie de synthèse des folates nécessaires à la production d'acides nucléiques par le parasite. Ils inhibent respectivement la dihydroptéroate synthase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR), enzymes impliquées dans la production d'acide folique pour la première et folinique pour la seconde.

- *Les naphtoquinones ou analogue de l'ubiquinone (atovaquone) :* Agissent sur tous les stades et sur toutes les espèces de *Plasmodium* infectant l'homme. Ils inhibent le transport de la dihydroororate déshydrogénase, enzyme essentielle au fonctionnement de la chaine de transfert des électrons de la mitochondrie.

- *Les antibiotiques (doxycycline) :* Agissent en inhibant la synthèse des protéines parasitaires.

* Les gamétocytocides :

- *Les amino-8-quinoléines* (primaquine) : Agissent contre les gamétocytes de *P. falciparum*, mais sont également efficaces contre les formes hypnozoïtes et peuvent donc être utilisés en traitement préventif de la rechute du paludisme à *P. vivax* et *P. ovale.*

* Les bithérapies :

Jusque dans les années 2000, les traitements étaient adaptés au niveau de résistance des parasites dans une zone donnée. Aujourd'hui, étant donnée l'ampleur mondiale de la résistance de *P. falciparum* à la plupart des molécules, l'OMS recommande l'usage de bithérapies et principalement de CTA (Combinaison Thérapeutique à base d'Artémisinine).

Ces associations de médicaments permettent d'augmenter l'efficacité du traitement et de lutter contre l'émergence de nouvelles résistances. Les CTA sont caractérisées par un dérivé d'artémisinine à action rapide, permettant d'éliminer rapidement les parasites présents dans le sang et donc de diminuer fortement la parasitémie, et d'une autre molécule d'une durée d'action plus longue, permettant d'éliminer les parasites restants et de prévenir de potentielles réinfections. La CTA la plus utilisée est l'artéméther/luméfantrine (COARTEM®), mais d'autres bithérapies hors CTA sont actuellement recommandées telles que l'atovaquone/proguanil (MALARONE®) utilisée essentiellement en prophylaxie, ou la sulfadoxine/pyriméthamine (FANSIDAR®) utilisée en traitement préventif intermittent chez la femme enceinte.

* Les traitements traditionnels :

A côté des antipaludiques prescrits, de nombreuses études ont montré que les populations habitant en zone d'endémicité palustre utilisaient pour se soigner des traitements traditionnels, par choix ou par manque d'accessibilité aux traitements dits conventionnels. Actuellement, deux des traitements antipaludiques majeurs (la quinine et l'artémisinine) sont d'origine naturelle et sont issus de plantes. La prise en considération des traitements traditionnels est une voie essentielle pour essayer de dégager de nouvelles pistes de traitements contre le paludisme.

Tableau 1 : Principales molécules antipaludiques actuellement recommandées par l'OMS

Molécules	Posologie et voie d'administration	Indications	Pharmacocinétique	Effets secondaires	Précautions d'emploi
Chloroquine	10mg/kg PO (à J1-J2) et 5 mg/kg (à J3)	Ttt du PS à *P. vivax, ovale, malariae,* et *knowlesi,* Non recommandé en chimioprophylaxie contre *Pf*	métabolisation hépatique, t ½ élimination longue (20-60 jours) à 50% par voie rénale	Rares et bénins (hématologiques, neurologiques, digestifs, prurit) Surdosage : rétinopathies	Si psoriasis, troubles visuels ou rénaux
Quinine	20 mg/kg perfusée en 4h (dose de charge), puis 10 mg/kg toutes les 8h (dose d'entretien) Ttt de 7 jours, relais PO possible à partir de 72h	Ttt du PS en particulier si résistance à la chloroquine. Non recommandée en chimioprophylaxie	Pic de concentration en 1-3h, t ½ vie courte, métabolisation hépatique (métabolite inactif), élimination urinaire	Digestifs, visuels, céphalées, hypoglycémie (rare) Si surdosage : troubles cardiorespiratoires graves	Sujet âgé, cardiopathie sous-jacente, hypokaliémie, prise d'un médicament allongeant l'espace QT, d'un diurétique ou antidépresseur CI : ATCD de fièvre bilieuse hémoglobinurique, troubles du rythme ou de conduction graves IAM : ttt par Méfloquine
Artésunate	IV, PO, IM, voie rectale 2,4 mg/kg (à H0-H12-H24), puis toutes les 24h (maximum 9 doses). Relais PO possible après 3 doses	Ttt de 1ère intention du PG (IV ou IM), et de pré-transfert (voie rectale), Ttt du PS à *Pf, vivax, ovale, malariae*, et *knowlesi* (en association)	Hydrosoluble, absorption rapide, métabolisation par les estérases plasmatiques et les CYP 2A4, élimination rapide dans les urines	Rares (anémie, hépatotoxicité, neurotoxicité, rash, bradycardie transitoire et allongement du QTc)	Atteinte rénale et/ou hépatique
Doxycycline	100mg/12h, PO	Ttt prophylactique, Ttt du PS et de relais du PG (en association)	Très lipophile, absorption rapide. Ne pas prendre avec une boisson lactée (diminution de l'absorption), éliminé à 40% dans les urines	Phototoxicité, ulcération œsophagiennes, troubles digestifs et cutanés, décoloration des dents chez les enfants Graves et rares : troubles hématologiques	Troubles digestifs CI : enfant < 8ans (décoloration des dents), grossesse (risque de nécrose hépatique, retard de croissance du fœtus)
Atovaquone – proguanil (Malarone)	4 cpm PO de 250mg/100mg/jour, pendant 3 jours	Ttt prophylactique, Ttt du PS chez les voyageurs rentrés d'une zone d'endémie palustre, Ttt alternatif du PG	Très lipophile, biodisponibilité faible, élimination hépatique et biliaire et t ½ élimination de 2-3 jours pour l'atovaquone, métabolisation hépatique et élimination urinaire pour le proguanil	Digestifs (douleurs abdominales, nausées, vomissements), céphalées, troubles de la circulation, rash, anémie, anorexie	CI : IR sévère (risque de pancytopénie lors d'une prise régulière en ttt prophylaxique)
Artéméther – luméfantrine (Coartem)	4 cpm PO de 20mg/120mg, en 6 prises (H0-H8-H24-H36-H48-H60)	Ttt du PS à *Pf, vivax, ovale, malariae*, et *knowlesi,* Ttt en relais PO lors de PG. Non recommandée en chimioprophylaxie Artéméther seul : Ttt de 2de intention du PG (voie IM), et de pré-transfert	Pic de concentration en 2h (artéméther) et 6-8h (luméfantrine), artéméther rapidement métabolisé en DHA, t ½ élimination de 2h (artéméther) et de 2-6 jours (luméfantrine)	Digestifs, perte d'appétit, troubles du sommeil, céphalées, rash Rares : cardiaques (palpitation, allongement de l'intervalle QT), troubles électrolytiques	Sujets âgés et enfants < 5kg, IH et IR sévères CI : 1er trimestre de grossesse, allongement du QT, déséquilibres électrolytiques

PO = per os = voie orale ; IV = voie intraveineuse ; IM = voie intramusculaire ; cpm = comprimé
Ttt = traitement ; PS = paludisme simple ; PG = paludisme grave ; *Pf* = *Plasmodium falciparum*
CI = contre-indication ; IAM = interaction médicamenteuse ; ATCD = antécédents ; IH = insuffisance hépatique ; IR = insuffisance rénale

I-5.2.2/ Traitement du paludisme à *Plasmodium falciparum*

** Traitement des formes simples :*

Le traitement de 1ère intention des accès palustre simples à *P. falciparum* consiste à administrer, durant 3 jours, une CTA par voie orale chez les patients de plus de 5 kg. Cinq CTA sont actuellement recommandées : artéméther-luméfantrine (COARTEM®/RIAMET®), artésunate-amodiaquine (AS/AQ), artésunate-méfloquine (AS/MQ), dihydroartémisinine-pipéraquine, et artésunate-sulfadoxine-pyriméthamine

Il est également conseillé de donner aux patients une dose de primaquine (0,25 mg/kg) combinée à une CTA afin de diminuer la transmission palustre dans les zones de faible endémicité. La primaquine n'est pas recommandée pour les enfants de moins de 6 mois ni pour la femme enceinte ou allaitante. En revanche, les antipaludiques tels que la quinine, la chloroquine, l'atovaquone/proguanil et la clindamycine sont des médicaments sûrs et efficaces pour la femme enceinte. La doxycycline est quant à elle contre-indiquée en raison des effets délétères sur l'ossification du fœtus.

En cas d'infection à *P. vivax, ovale, malariae* ou *knowlesi,* le traitement est basé sur les CTA ou la chloroquine. Afin de prévenir les rechutes dues à *P. vivax* et *ovale,* il est conseillé d'administrer 0,25-0,5mg/kg/jour de primaquine pendant 2 semaines. Ce médicament permet d'éliminer les hypnozoïtes hépatiques et donc d'éviter les récidives de paludisme.

** Traitement des formes graves :*

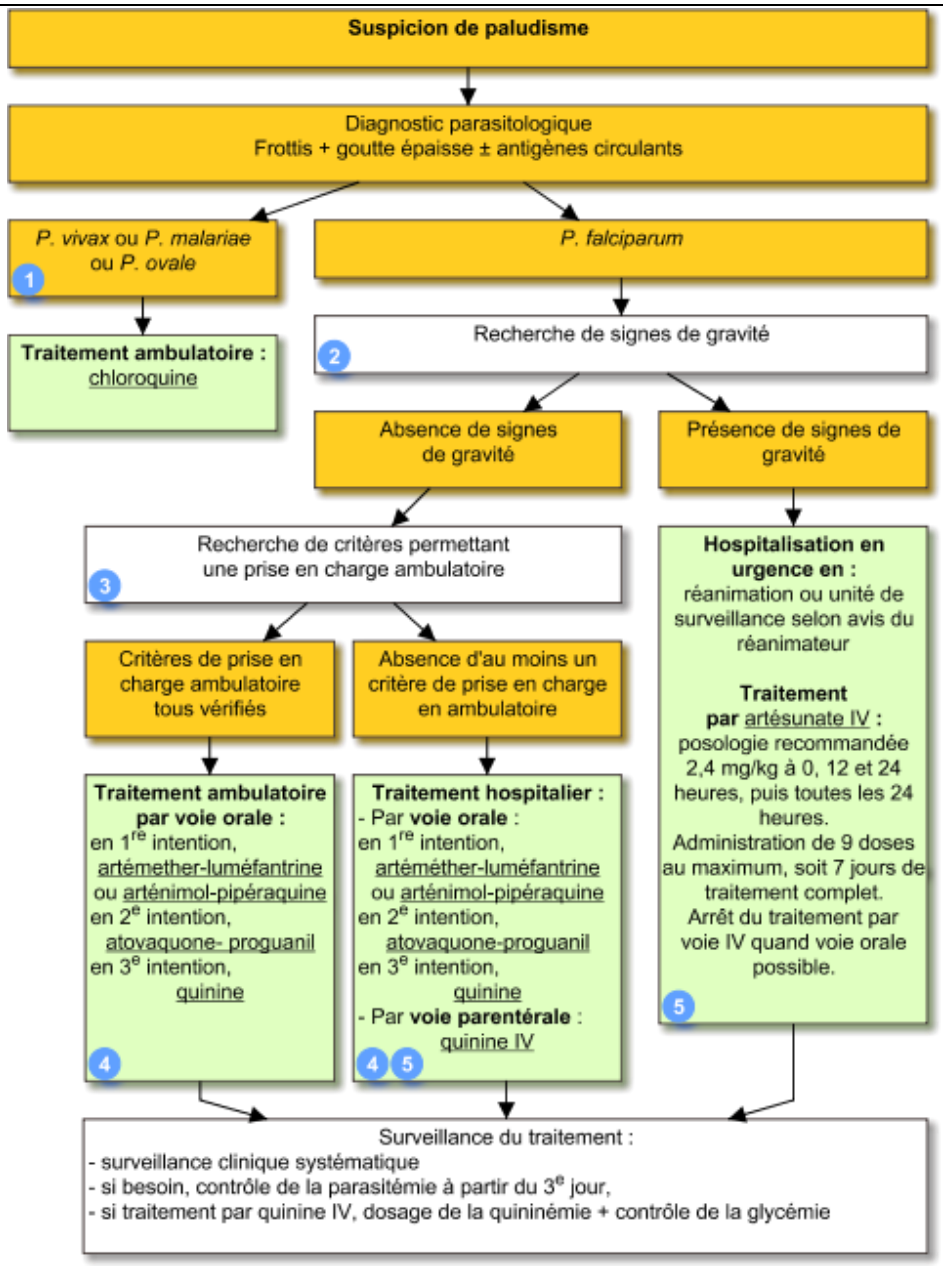
- Artésunate (1ère intention) : 2,4 mg/kg en perfusion IV ou IM (3 mg/kg pour les enfants <20 kg) à H0-H12-H24, puis basculer dès que possible (3 doses minimum) vers un relais *per os.*
- Artéméther (2ème intention) : 3,2 mg/kg par voie IV, puis 1,6 mg/kg/jour.
- Dichlorhydrate de quinine (3ème intention) : 20 mg/kg en perfusion IV (jamais en bolus) à H0 puis 10 mg/kg toutes les 8h.

Les traitements par voie injectable doivent être administrés durant au moins 24h, même si un relais *per os* est possible. Les traitements relais *per os* correspondent à l'administration d'une CTA. En cas de neuropaludisme, ne pas administrer de l'artésunate-méfloquine en raison des risques de réactions neuropsychiatriques.

Si le temps entre la décision de traiter et le traitement définitif est supérieur à 6h, un traitement de pré-transfert est mis en place. Ce dernier est identique au traitement des formes graves énoncées ci-dessus (artésunate, artéméther, quinine), mais est donné en IM.

Chez la femme enceinte, les mêmes antipaludiques (artésunate, artéméther, quinine) sont administrés en IV quel que soit le stade de la grossesse et le plus rapidement possible sans diminution des doses.

Le traitement des formes graves à *P. vivax* et *P. knowlesi* est identique à celui de *P. falciparum*. Une administration de primaquine est également conseillée.



Critères de prise en charge en ambulatoire :
L'absence d'un seul de ces critères nécessite l'hospitalisation : diagnostic parasitologique fiable (contact direct entre le médecin et le biologiste) ; absence de situation d'échec d'un 1er traitement ; paludisme simple, sans signe de gravité clinique ou biologique ; absence de trouble digestif (vomissements, diarrhée importante, etc.) ; parasitémie < 2 % ; plaquettes > 50 000/mm3, hémoglobine > 10 g/dl, créatininémie < 150 µmol/l ; absence de facteur de risque (sujet âgé, sujet fragilisé par une affection associée, dont cardiopathie, patient splénectomisé) ; absence de grossesse ; patient entouré et garantie d'une bonne observance ; vérification d'une délivrance immédiate du traitement ; résidence à proximité d'un établissement hospitalier ; consultations de suivi à J3, J7 et J28 et contact téléphonique possibles.

Figure 8 : Algorithme de prise en charge lors d'une suspicion de paludisme (source : VIDAL)

I-6. Prévention et lutte

I-6.1) Les moyens actuellement disponibles

I-6.1.1/ Lutte antivectorielle

** Modification du milieu :*

- Drainage, assèchement du milieu et élimination ou nettoyage de tout support pouvant stocker de l'eau nécessaire au développement des moustiques (seau, pneu, …)
- Traitement de l'eau stagnante avec des produits chimiques ou des larvicides
- Introduction d'espèces prédatrices des différentes étapes de développement du moustique

** Mesure de protection personnelle :*

- Port des vêtements longs, légers et imprégnés de répulsifs
- Application de répulsifs cutanés sur les parties découvertes du corps (bras, chevilles, pieds, …). L'effet des répulsifs et l'indice de protection sont diminués avec la transpiration, la crème solaire et les douches.

* *Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides (MII) et pulvérisation intradomiciliaire d'insecticides à effet rémanent :* Ces techniques reposent sur l'utilisation d'insecticides principalement issus de 4 classes : les pyréthrinoïdes, les organochlorés, les carbamates et les organophosphorés. La MII traitée par un pyréthrinoïde est l'outil de prévention principal et le plus efficace. Selon l'OMS, l'utilisation des MII permettrait d'éviter 70% des cas de paludisme. Pour une efficacité optimale, sa durée d'utilisation est estimée à 2 à 3 ans (52). Cependant, un des problèmes majeurs des dernières années est l'apparition d'une résistance largement étendue aux 4 classes d'insecticides couramment utilisées dans les régions endémiques.

* *Modification du génome :* De nouvelles stratégies de lutte antivectorielle se penchent sur des techniques de modification du génome du moustique comme par exemple le lâcher de mâles stériles ou la modification du génome des moustiques les rendant réfractaires à toute infection palustre.

I-6.1.2/ Traitement préventifs

* *Chimioprophylaxie des voyageurs :* Elle permet aux personnes séjournant en zone d'endémicité palustre de se protéger partiellement contre le paludisme à *P. falciparum*. En effet, l'objectif est de garder une concentration d'antipaludique dans le sang. Il ne garantit pas une protection absolue mais permet de diminuer les risques de développer un paludisme grave.

Le choix de la molécule tient compte du lieu de séjour (risque palustre, intensité de transmission, résistance, voyage itinérant ou non), de la durée et la période du séjour, et des caractéristiques du sujet (âge, poids, grossesse, antécédents, allergie, contre-indication, …).

Les molécules actuellement recommandées ainsi que les modalités de prises sont résumées dans le tableau 2 (6). Le traitement préventif doit être poursuivi après le retour d'une zone d'endémicité palustre, cette durée est dépendante de la molécule prescrite. En cas de séjour inférieur à une semaine, une chimioprophylaxie n'est pas forcément obligatoire. Dans le cas d'un séjour de longue durée, un traitement préventif est généralement donné afin de couvrir les 6 premiers mois.

* *Traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIg) :* Ce traitement préventif consiste à administrer de la sulfadoxine-pyriméthamine (3 doses minimum, espacées d'au moins un mois) à toutes les femmes enceintes vivant en zone d'endémicité moyenne à forte, lors des consultations prénatales après le 1er trimestre de grossesse (1).

* *Traitement préventif intermittent du nourrisson (TPIn) :* Pour les enfants de moins d'un an vivant dans des zones de forte endémicité palustre, l'OMS recommande l'utilisation de sulfadoxine-pyriméthamine (3 administrations durant la première année de vie : à 10 et 14 semaines puis à 9 mois) en même temps que les vaccins systématiques (DTP, rougeole) (1).

* *Chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) pour les enfants de moins de 5 ans :* Dans les zones de forte endémicité palustre, l'OMS recommande l'administration d'amodiaquine et de sulfadoxine-pyriméthamine (traitement d'un mois), durant la saison des pluies chez les enfants de moins de 5 ans vivant en Afrique sub-saharienne (1).

Tableau 2 : Médicaments utilisés en chimioprophylaxie du paludisme chez l'adulte et l'enfant (source : santepubliquefrance, BHE 2019 (6))

Molécule	Présentations	Posologies enfant et adulte	Durée, indications, précautions d'emploi, contre-indications
Atovaquone-Proguanil	Cp* pédiatrique (cpP) à 62,5 mg/25 mg Cp* adulte (cpA) à 250 mg/100 mg	Enfant : 5-7 kg : dose équivalente à ½ cpP/j (hors AMM, préparation magistrale nécessaire) 8-<11 kg : dose équivalente à ¾ cpP/j (hors AMM, préparation magistrale nécessaire) 11-<21 kg : 1 cpP/j 21-<31 kg : 2 cpP/j 31-≤40 kg : 3 cpP/j >40 kg : 1cpA/j Adulte : 1 cpA/j	– À prendre au cours d'un repas ou avec une boisson lactée, à heure fixe – **Début du traitement** : 24 à 48 h avant le jour d'entrée dans la zone à risque ou le jour d'entrée selon les indications du fabricant – À prendre pendant le séjour et 1 semaine après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme – **La restriction de son utilisation au-delà de 3 mois a été levée** – Peut-être envisagé, si nécessaire, chez la femme enceinte – **Effets indésirables** : augmentation de l'INR** pour les patients sous AVK***
Chloroquine	Sirop à 25 mg=5 ml Cp* sécable à 100 mg	Enfant : **1,7 mg/kg/j** <10 kg: 25 mg 1 j/ 2. ≥10-16 kg : 25 mg/j >16-33 kg : 50 mg/j >33-45 kg : 75 mg/j >45 kg : 1 cp/j Adulte : 1 cp/j	– À prendre le jour du départ, pendant le séjour et pendant 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme – Ne doit pas être utilisée chez la femme enceinte ou qui allaite sauf en l'absence d'alternative plus sûre – Contraception nécessaire chez les hommes et femmes en âge de procréer pendant le traitement et jusqu'à 8 mois après l'arrêt du traitement (*cf.* rubriques 4.6 et 4.3 du RCP mis à jour le 24/07/2018) – Attention aux intoxications accidentelles
Chloroquine-Proguanil	Cp* à 100 mg/200 mg	Enfant : à partir de 15 ans et >50 kg : 1 cp/j Adulte : 1 cp/j	– À prendre en fin de repas, au moins 24 h avant le départ, pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme – Réservé aux adultes et adolescents de 15 ans et plus et pesant au moins 50 kg – Pour la femme enceinte ou qui allaite : se référer aux modalités préconisées pour la chloroquine – **Effets indésirables** : augmentation de l'INR** pour les patients sous AVK***
Doxycycline	Cp* à 50 mg Cp* à 100 mg Cp* sécable à 100 mg	Enfant : ≥8 ans et <40 kg : 50 mg/j ≥8 ans et ≥40 kg : 100 mg/j Adulte : 100 mg/j :	– À prendre pendant le repas du soir au moins 1 heure avant le coucher, la veille du départ, pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme – **Contre-indications** : femme enceinte, enfant âgé de moins de 8 ans – **Effets indésirables** : • photosensibilisation • potentialisation de l'effet des AVK*** par modification de la flore saprophyte
Méfloquine (Voir encadré ci-dessous)	Cp* sécable à 250 mg	Enfant : **5 mg/kg/semaine** 5-14 kg : 5 mg/kg/sem, (≈ 1/8 cp/sem), (hors AMM) 15-19 kg : ¼ cp/sem >19-30 kg : ½ cp/sem >30-45 kg : ¾ cp/sem >45 kg : 1 cp/sem Adulte : 1 cp/sem	– À commencer 10 jours avant le départ jusqu'à 3 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme – Pour les sujets n'ayant jamais pris de méfloquine : première prise 10 jours avant l'exposition au risque afin de vérifier l'absence d'effets secondaires lors de la deuxième prise, soit 3 jours avant l'entrée dans la zone à risque – Ce délai de 10 jours n'est pas indispensable pour les sujets connus pour supporter la méfloquine et n'ayant pas de contre-indication apparue à la date de la nouvelle prise – **Contre-indications** : convulsions, troubles neuropsychiques – **Déconseillé en cas de pratique de la plongée** – Peut-être administré à la femme enceinte
Proguanil	Cp sécable à 100 mg	Enfant âgé de 1 à 12 ans : **3 mg/kg/j** 9-17 kg : ½ cp/j > 17-33 kg : 1cp/j >33,5-45 kg : 1cp ½ /j Adulte et enfant âgé de plus 12 ans : 200 mg/j	– Uniquement en association avec la chloroquine – À prendre pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme – Pour la femme enceinte: appliquer les nouvelles modalités d'emploi dès leur publication (RCP en cours de révision), en raison de l'association avec la chloroquine – **Effets indésirables** : augmentation de l'INR** pour les patients sous AVK***

* Cp : comprimé. **Avant l'âge de 6 ans pour des raisons pratiques, il peut être nécessaire d'écraser les comprimés.**
** INR : *International Normalized Ratio.*
*** AVK : anti-vitamine K (warfarine, acénocoumarol, fluindione).

I-6.1.3/ La recherche vaccinale

L'immense majorité des recherches vaccinales actuellement en cours s'intéressent à *P. falciparum* car c'est l'espèce plasmodiale la plus dangereuse pour l'homme. Des dizaines de candidats vaccins sont actuellement testés (essais cliniques de phase I, II ou III). Certains vaccins ciblent le stade pré-érythrocytaire ou hépatique (RTS,S/ASO1, ChAd63/MVA ME-TRAP, PfSPZ), d'autres la phase sanguine (GMZ2, P27A, MSP3), d'autres le cycle sexué.

Le RTS,S/AS01, ou Mosquirix®, est le candidat vaccin le plus avancé. Il a en effet terminé les essais de phase III et a démarré des tests à grande échelle dans le cadre d'études pilotes de l'OMS. Ce vaccin est composé de deux antigènes : la protéine de surface du sporozoïte de *P. falciparum* ou circumsporozoïte (CSP) et la protéine de l'hépatite B (HBs), formant alors des particules non infectieuses appelées VLP (Virus-Like-Particle). Ces dernières sont produites par recombinaison d'ADN dans des levures de *Saccharomyces cerevisiae* permettant d'obtenir des protéines recombinantes purifiées (53). L'adjuvant AS01 est ajouté afin d'améliorer l'efficacité du vaccin. Il est composé de liposomes, de lipides A monophosphorylés (MLP, composants bactériens non toxique) et de QS21 (une saponine).
Dans les années 1990, le docteur Joe Cohen du laboratoire GlaxoSmithKine (GSK) eut l'idée d'associer des extraits de CSP de *P. falciparum* à un Ag de surface du virus de l'hépatite B créant alors le vaccin RTS,S. Comme tous les vaccins, ce dernier a pour but de stimuler le système immunitaire de l'organisme en produisant des Ac protégeant le patient en cas d'infections ultérieures. A la fin des années 1990, les études cliniques de phase I réalisées aux Etats-Unis sur des adultes volontaires sains, révèlent que le RTS,S n'est pas dangereux pour l'homme et que 6 patients sur 7 ont été immunisés. Dans les années 2000, les premiers tests de phase II sont réalisés sur des enfants et adolescents vivant dans des zones endémicité palustre en Afrique. Les essais de phase III ont été menés entre 2009 et 2014 sur environ 15 000 enfants dans 7 pays d'Afrique sub-saharienne (Burkina Faso, Gabon, Ghana, Kenya, Malawi, Mozambique et Tanzanie). Deux tranches d'âge ont été ciblées : les nourrissons et les jeunes enfants. Le vaccin n'a présenté aucun effet indésirable grave, mais des convulsions fébriles sans conséquence sur la santé des patients ont parfois été décrites dans les jours suivants l'injection. Les résultats de ces essais indiquent que le vaccin ne confère qu'une protection partielle face au paludisme chez le jeune enfant ayant reçu 4 doses du vaccin (environ 56% des 5-17 mois et 31% des 6-12 semaines ont été protégés lors de leur première infection palustre). De plus, l'efficacité de cette protection diminue considérablement au bout d'un an. Malgré cela, en juillet 2015, l'Agence Européenne du Médicament (EMA) donne un

avis scientifique favorable au Mosquirix® afin qu'il soit utilisé chez les enfants de 1,5 à 17 mois vivant en zone d'endémicité palustre (54). Cependant, du fait de sa protection modeste, l'EMA insiste sur le fait que ce vaccin se positionne comme un outil complémentaire aux différentes mesures préventives, de diagnostic et de traitement et n'a pas pour but de remplacer les traitements actuellement efficaces contre le paludisme. En octobre 2015, 2 groupes consultatifs indépendants de l'OMS recommandent la mise en œuvre de projets pilotes dans quelques pays d'Afrique sub-saharienne (55). En janvier 2016, l'OMS accepte les recommandations des groupes consultatifs et reconnait le potentiel du Mosquirix® en termes de santé publique. Les vaccinations ont débuté entre avril et septembre 2019 au Ghana, Kenya et Malawi et devraient se terminer en 2023, avec comme objectif de vacciner 360 000 enfants par an. Ce projet vise à évaluer la faisabilité de l'administration des 4 doses requises du vaccin, son innocuité et son impact en santé publique (56). En octobre 2020 et malgré la pandémie de COVID-19, environ 500 000 enfants ont reçu leur première dose vaccinale dans les trois pays concernés.

I-6.2) Bilan et objectifs de l'OMS

La prévention sauve des vies, et de plus en plus de personnes à risque ont accès à des outils de prévention efficaces. Une bonne utilisation des MII, la pulvérisation d'insecticides, et le traitement préventif pour les personnes à risque permettraient de réduire considérablement la mortalité due au paludisme. En effet, le nombre de personnes ayant accès à des outils de prévention reste encore trop faible. En Afrique sub-saharienne, le pourcentage de la population à risque ayant accès à des MII a augmenté ces dernières années mais se stabilise depuis 4 ans. En 2019 dans cette région, l'OMS a estimé qu'environ 50% des personnes n'étaient pas protégées par des MII et seulement 2% étaient protégées par des pulvérisations intradomiciliaires (11, 57). Concernant la mise en œuvre des traitements préventifs, en 2019, plus de 65% des femmes enceintes à risque n'ont pas pu bénéficier des 3 doses minimales requises pour le TPIg. Selon l'OMS, la chimioprévention du paludisme saisonnier pour les enfants de moins de 5 ans permettrait de diminuer de 75% le nombre de paludismes graves. En 2019, 21 millions d'enfants dans 13 pays africains ont recu cette thérapie préventive contre seulement 0.2 millions dans deux pays en 2012 (11).

Des efforts restent tout de même à fournir. Le paludisme est une maladie que l'on peut prévenir et traiter. « Tout décès imputable au paludisme, maladie qu'il est possible d'éviter ou

de traiter, est simplement inacceptable », Dr P. Alonso, Directeur du Programme mondial de lutte antipaludique à l'OMS.

En 2015, l'OMS a proposé « La stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 ». Cette dernière vise à lutter plus efficacement contre le paludisme en ayant pour objectif de réduire l'incidence et la mortalité de 90% en 2030 (8). En 2020, les objectifs intermédiaires visant une réduction d'au moins 40% de l'incidence et de la mortalité dues au paludisme n'ont pas été remplis. La mortalité n'a été réduite que de 18% alors que l'incidence a baissé de seulement 3% entre 2015 et 2020 (11). Cette stratégie mondiale vise également l'élimination de la maladie dans au moins 35 des 91 pays où la transmission du paludisme sévissait toujours en 2015. L'élimination du paludisme dans un pays implique qu'aucun cas autochtone n'ait été décrit dans le pays durant au moins 3 ans. Depuis 2015, la région européenne a stoppé la transmission autochtone (22), et plusieurs pays ont récemment éliminé le paludisme : le Sri Lanka et le Kirghizistan (2016), le Paraguay et l'Ouzbékistan (2018), l'Argentine et Algérie (2019) (11). Pour la 3ème année consécutive, la Chine et le Salvador n'ont rapporté aucun cas de paludisme autochtone et ont effectué une demande de certification officielle auprès de l'OMS pour l'élimination du paludisme (1). D'autres pays comme l'Iran, le Timor-Leste, ou la Malaisie ont également déclaré aucun cas de paludisme autochtone en 2018 et 2019, tout comme le Belize et le Cap-Vert en 2019. En novembre 2018, l'OMS a lancé l'approche « High Burden to High Impact » (D'une Charge Elevée à un Fort Impact) dans les 11 pays les plus durement touchés par le paludisme (Burkina Faso, Cameroun, Congo, Ghana, Mali, Mozambique, Niger, Nigeria, Ouganda, Tanzanie, Inde). Ce programme encourage des stratégies plus locales et adaptées aux pays, afin d'accélérer la lutte contre le paludisme.

Cependant, l'investissement internationnal et national dans la lutte contre le paludisme reste trop faible pour atteindre les objectifs fixés par l'OMS. En 2019, les fonds de lutte contre le paludisme étaient de 3 milliards de dollars (dont 663 millions investis dans la recherche et le développement de produits antipaludiques), soit une baisse des investissements par rapport aux années précédentes et aux 5,6 milliards de dollars nécessaires que l'OMS estimait pour répondre aux objectifs à l'horizon 2030 (1). Les pays les plus endémiques pour le paludisme ne disposent toujours pas de moyens financiers et matériels suffisants pour développer une véritable stratégie d'élimination du paludisme, adaptée aux populations et aux conditions locales. Celle-ci implique notamment des centres de santé accessibles en termes de coût et d'éloignement du lieu d'habitation, un nombre plus élevé de personnels de santé déployés

dans les pays, une surveillance efficace afin d'évaluer la répartition de la maladie (incidence, prévalence, distribution géographique et sociale), l'apparition de résistances potentielles et encore l'efficacité des moyens de lutte (lutte antivectorielle, antipaludiques, …). La surveillance et les renseignements recueillis au niveau local, tout comme la participation accrue des gouvernements et des communautés sont indispensables pour s'adapter et optimiser les interventions de lutte antipaludique dans chacune des régions touchées. Ce combat contre le paludisme ne pourra être gagné qu'avec l'aide de nouveaux outils et stratégies innovants, l'investissement dans la recherche est essentiel afin de développer ces nouvelles approches. Malheureusement, selon l'OMS, depuis 10 ans, aucun « produit véritablement révolutionnaire » n'a été mis sur le marché.

I-7. Résistance parasitaire

Les premières résistances aux insecticides et aux molécules antipaludiques sont apparues dans les années 1960 en Asie et en Amérique du Sud, avec une résistance progressive à la chloroquine, qui s'est répandue en Afrique environ 20 ans plus tard. La résistance à la méfloquine est quant à elle apparue dans les années 1990 en Asie du Sud-Est, 5 ans seulement après le début de son utilisation. Une trop forte pression médicamenteuse a conduit à la sélection de mutations permettant aux parasites de résister aux traitements (58).

La résistance de *P. falciparum* à la chloroquine est due à la mutation d'un gène situé sur le chromosome 7 et codant pour la protéine *Pf*crt (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) (59). Les résistances à la luméfantrine et à l'amodiaquine sont associées à une mutation du gène codant pour le transporteur *Pf*mdr1 (*P. falciparum* multidrug resistance transporter 1) (60). De plus, les mutations des gènes codant pour la dihydroptéroate synthéase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (DHFR), respectivement enzymes cibles des antipaludiques antifoliques et antifoliniques, rendent ces médicaments inefficaces (61).

Afin de lutter contre ces résistances, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont ainsi été mises en œuvre comme le développement d'associations médicamenteuses et, dans les années 1990, la mise sur le marché des médicaments à base d'artémisinine. Malheureusement, l'efficacité de ces nouvelles molécules a progressivement diminué avec l'apparition de nouvelles résistances, notamment en Asie, entrainant une augmentation du temps nécessaire à la clairance parasitaire (62, 63). Afin de limiter le risque de propagation de cette résistance, les médicaments à base d'artémisinine sont associés à un autre antipaludique localement efficace pour former les CTA. La résistance à l'artémisinine est due à des mutations du génome de *P.*

falciparum au niveau du gène *PgKelch13* et touche actuellement l'Asie du sud-est mais également la Papouasie Nouvelle-Guinée, la Guyane, le Rwanda, l'Erythrée, l'Ethiopie, la Somalie et le Soudan, sans affecter, pour l'instant, l'efficacité des antipaludiques de 1ère intention dans les pays d'afrique. En revanche en Asie du Sud-Est, les échecs thérapeutiques des CTA de 1ère intention se multiplient et ont même atteints 93% en Thaïlande. En Afrique pour l'instant l'efficacité des CTA est supérieure à 98% et n'a jamais diminué (11, 64).

La résistance aux antipaludiques a de nombreuses conséquences : elle induit de plus en plus d'échecs thérapeutiques et d'infections recrudescentes, une augmentation de la prévalence de la maladie et de la gravité des signes cliniques et une augmentation du nombre de traitements administrés chaque année. Les zones de résistance s'étendent, le nombre de souches résistantes augmente, ainsi que le niveau de résistance. Il est également maintenant possible d'observer des poly-résistances dans une même zone endémique. Lutter contre ce phénomène constitue donc un défi majeur actuel et pour les prochaines années, d'autant plus qu'aucun vaccin n'est actuellement disponible et que l'industrie pharmaceutique peine à trouver de nouvelles molécules efficaces contre le paludisme.

« Il est temps pour les dirigeants de toute l'Afrique, mais aussi du monde entier, de relever le défi du paludisme une fois encore, comme ils l'avaient fait lorsqu'ils ont jeté les bases des avancées réalisées depuis le début de ce siècle. À travers une action commune et un engagement à n'oublier personne, nous pourrons concrétiser notre vision partagée d'un monde sans paludisme. » Dr Tedros Adhanom Ghebreyesus, Directeur général de l'OMS, novembre 2020.

II – PATHOGENESE ET MECANISMES DE DEFENSE DE L'HOTE

II-1. Facteurs génétiques et résistance innée

Certains facteurs génétiques jouent un rôle déterminant dans la pathologie palustre et confèrent aux individus concernés une résistance innée naturelle mais partielle contre le paludisme. Cette protection joue un rôle contre l'invasion du GR par le parasite et sa croissance intra-érythrocytaire, mais permet également d'augmenter la réponse immunitaire de l'homme contre les GRi et favoriser leur phagocytose. Les principales anomalies génétiques liées au GR sont détaillées ci-dessous.

* *Hémoglobinopathies (drépanocytose et thalassémies) :* La drépanocytose, ou anémie falciforme, est une maladie héréditaire caractérisée par une forme anormale de l'hémoglobine appelée HbS. Cet allèle S anormal, se distingue de l'Hb normale A, par son insolubilité et sa propension à se cristalliser conduisant à une déformation des GR qui adopteront une forme plus allongée. Ainsi, les personnes portant la mutation homozygote S/S sur le gène de l'Hb présentent une maladie chronique grave, alors que les porteurs de la mutation hétérozygote (A/S) sont asymptomatiques. Le trait drépanocytaire (A/S) est associé à une protection partielle du paludisme, en particulier des formes graves (65–67). Cette protection s'explique par la difficulté pour le parasite à pénétrer et se développer correctement à l'intérieur des hématies. De plus, des recherches ont montré que les GR drépanocytaires seraient mieux détectés par le système immunitaire et présenteraient une plus faible expression de *Pf*EMP1 limitant ainsi leur séquestration observée lors des formes graves de paludisme (68). Une autre étude menée dans un modèle expérimental de neuropaludisme, suggère que la drépanocytose confère une protection face à l'infection en induisant, dans le cerveau des souris drépanocytaires, l'augmentation de l'expression de l'hème oxygénase (HO-1), enzyme connue pour ses propriétés antioxydantes et sous le contrôle du facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) (69).

Les alpha- et bêta- thalassémies sont des hémoglobinopathies caractérisées par un déficit de synthèse des chaines de globine. Le lien entre ces pathologies et la protection palustre a été discuté dans de nombreuses études (70, 71). La résistance au paludisme pourrait être due à

une augmentation de la phagocytose des GRi thalassémiques ou à une meilleure détection des GRi par le système immunitaire et notamment des Ac (72).

* *Enzymopathie (Déficit en Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase) :* Le déficit en G6PD, ou favisme, inhibe la production de NADPH dans le GR, nécessaire à la production de glutathion, peptide clé de la réponse antioxydante. Ainsi, ce déficit enzymatique réduit les capacités du GR à lutter contre le stress oxydant et fragilise la membrane plasmique. La protection induite par cette enzymopathie contre les paludismes graves reposerait alors sur une augmentation de la phagocytose des GRi par les monocytes humains permettant ainsi une évolution clinique favorable (73–75).

* *Polymorphisme érythrocytaire (l'antigène DUFFY) :* En Afrique, une majorité de personnes porte le gène *DUFFY* négatif. Ainsi, leurs GR ne présentent pas à leurs surfaces le récepteur membranaire DUFFY nécessaire à la pénétration du parasite, ils sont alors résistants à *P. vivax* (76). Cela explique la forte proportion de ces populations DUFFY négatif en Afrique mais également l'absence de *P. vivax* dans ces zones de forte endémicité palustre (77).

* *Groupe sanguin et paludisme :* Des études ont mis en évidence que le groupe sanguin O apporterait une certaine protection contre le paludisme grave (78, 79).

II-2. Immunité antiplasmodiale

La réaction immunitaire développée chez l'homme lors d'une infection à *P. falciparum* est complexe et dépendante de nombreux facteurs humains, parasitaires et environnementaux. Elle met en jeu à la fois l'immunité innée, non spécifique, première barrière face à l'infection, et l'immunité acquise ou adaptative. En effet, avec l'âge et à force d'expositions régulières au parasite, l'homme peut développer une certaine immunité protectrice appelée prémunition. Une collaboration étroite entre les réponses immunitaires innée et acquise à travers leurs différentes populations cellulaires est mise en place afin de lutter efficacement contre l'infection palustre.

Des modèles murins ont été développés et sont actuellement très utiles pour comprendre la pathogénèse de la maladie, les mécanismes immunitaires et les gènes mis en jeu pour lutter contre l'infection, ainsi que les pistes de traitements. De nombreuses souches murines de *Plasmodium* sont disponibles et utilisées en routine. Parmi elles, *P. chabaudi* permet de mimer chez la souris C57BL/6 un paludisme simple non létal alors que *P. berghei ANKA*

mime un paludisme cérébral. A ce jour, aucun modèle de rongeur ne peut reproduire la complexité de l'infection palustre chez l'homme, que ce soit dans la physiopathologie ou dans la réponse immunitaire. Les différents modèles d'étude du paludisme *in vivo* et *in vitro* seront plus largement décrits dans le chapitre II de la partie II.

II-2.1) Immunité innée

L'immunité innée est le premier mécanisme de défense mis en place par l'homme pour lutter contre une infection palustre et l'inflammation qui en résulte. Elle est essentielle dans le contrôle du premier pic de parasitémie au tout début de l'infection et intervient dans l'activation de la réponse humorale. La réponse immunitaire innée est induite suite à l'interaction entre les récepteurs du soi appelés PRR (Pattern Recognition Receptors) et les molécules pathogènes PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) (80, 81). Différents PRR ont été identifiés à la surface des cellules immunitaires et jouent un rôle dans la pathologie palustre. On retrouve les Toll-Like Récepteurs (TLR), les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines, ou encore les récepteurs scavengers tels que CD36. Chez *Plasmodium*, les PAMP sont de nature diverse dont principalement les ancres GPI (glycosylphosphatidylinositol), l'ADN parasitaire et l'hémozoïne. Certains facteurs endogènes appelés DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) peuvent également activer les PRR et induire une réponse immunitaire, on compte par exemple l'hème, l'acide urique, ou encore les vésicules extracellulaires (82). Les principales populations cellulaires de l'immunité innée jouant un rôle dans le contrôle de l'infection palustre sont les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les polynucléaires neutrophiles, les cellules Natural Killer (NK), les cellules NKT et les lymphocytes T γδ (LTγδ), sans oublier le rôle du système du complément (3, 83).

II-2.1.1/ Les principales populations cellulaires

** Les monocytes/macrophages :*

Les monocytes sont des cellules sanguines immatures issues de la moelle osseuse. Ils circulent dans le sang périphérique jusqu'à arriver dans les tissus résidents où ils se différencieront en macrophages. L'étude des monocytes/macrophages et leurs rôles dans la pathologie palustre constitue le centre de mon travail de thèse et sera développé dans le chapitre II-3 de cette partie. Brièvement, ils ont de nombreuses propriétés essentielles dans le contrôle et la résolution de l'infection palustre. En effet, ce sont des cellules présentatrices

d'antigènes (CPAg), impliquées dans la phagocytose des GRi par *P. falciparum* et des mérozoïtes libres dans le sang. De par leur grande variabilité phénotypique et fonctionnelle, les monocytes/macrophages sont également capables de produire de nombreuses cytokines pro- et anti-inflammatoires, ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNI) comme l'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$) (83).

** Les cellules dendritiques :*

Les cellules dendritiques sont les CPAg majoritaires de l'organisme et sont essentielles dans la mise en place des réponses innée et acquise *via* la présentation des antigènes et l'activation des lymphocytes T et B dans les organes lymphoïdes secondaires (84). Leur fonction de CPAg leur permet de détecter et phagocyter des protéines plasmodiales *via* leurs récepteurs membranaires TLR (Toll-Like Receptors) et les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) (3). Les gènes du CMH sont divisés en 3 classes dont les deux principales sont le CMH-I et le CMH-II permettant respectivement la présentation de peptides antigéniques aux LT CD8 et LT CD4 dans les organes lymphoïdes secondaires. Chez l'homme le CMH est appelé système HLA. Une autre fonction des cellules dendritiques est le déclenchement d'une réponse cytokinique importante avec notamment la production précoce de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron gamma (IFNγ) et l'interleukine 12 (IL-12), amplifiant les réponses immunitaires innées nécessaires à l'élimination du parasite (85, 86). De plus, des travaux ont montré que *Plasmodium* pouvait inhiber la maturation des cellules dendritiques et ainsi limiter la mise en place de l'immunité adaptative essentielle dans la lutte antiparasitaire (87, 88).

** Les polynucléaires neutrophiles :*

Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires en contact avec le parasite. Elles agissent dès l'entrée de *Plasmodium*, au niveau de la peau, lors d'une piqûre de moustique infecté (89, 90). S'il est certain que leur population augmente dès l'injection de parasites, leur rôle exact dans l'élimination de ces derniers est encore discuté (89, 90). Durant la phase sanguine, les cellules immunitaires telles que les monocytes/macrophages, produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFNγ, le Facteur de Nécrose Tumorale alpha (TNFα), l'IL-1β, ou encore la chimiokine MCP-1 (également appelée CCL2), qui favorisent l'activation des neutrophiles et amplifient leur capacité à phagocyter les mérozoïtes libres dans le sang (83). De plus, la production intracellulaire d'espèce réactives de l'oxygène (ROS) par les neutrophiles lors de la phagocytose, créée un environnement de stress oxydant néfaste pour le parasite qui sera alors détruit (91).

** Les cellules Natural Killer :*

Les cellules NK (NK) constituent une population hétérogène se différenciant des lymphocytes par l'absence du marqueur CD3 et l'expression de marqueurs de surface tels que CD56 et CD16 (92). Les cellules NK jouent un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire face à l'infection palustre en produisant de façon précoce des quantités importantes d'IFNγ essentielles dans le contrôle de la parasitémie en début d'infection, mais également d'IL-12, IL-18, et de TNFα, avant même la détection de parasites dans le sang des patients (93–97). Néanmoins, il semblerait que des signaux supplémentaires issus d'autres populations cellulaires de l'immunité innée, soient nécessaires pour l'activation des cellules NK et la production d'IFNγ. En effet, des études ont montré que les cellules NK sont activées directement par les monocytes/macrophages ou suite à la production d'IL-12 et IL-18 (85, 98, 99). A leur tour, elles pourront alors amplifier la réponse immune et activer les différentes populations de cellules immunitaires par la production d'IFNγ. Dans un modèle murin de paludisme non létal, la diminution du nombre de cellules NK a été associée à une augmentation de la parasitémie et une inhibition de la maturation des cellules dendritiques démontrant le rôle essentiel de cette population dans le contrôle précoce de l'infection palustre (100). Il a également été montré *in vitro* que les cellules NK ont la capacité de lyser directement les GRi par *P. falciparum* en libérant des facteurs cytotoxiques (93, 101, 102). Plus récemment, des études ont démontrés que les cellules NK pouvaient participer à la phagocytose des GRi via leur système ADCC (Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity) dont nous reparlerons plus loin (103, 104).

** Les cellules NK T :*

Les NKT constituent une population hétérogène de lymphocytes ayant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles à mi-chemin entre les LT et les cellules NK. En effet, chez la souris, les NKT expriment à la fois le marqueur NK1.1 et des sous-unités du récepteur TCR des lymphocytes T. Une étude a montré que les NKT inhibent la croissance des parasites intra-hépatiques chez la souris et permet ainsi de limiter leur dissémination dans la circulation sanguine (105). D'autres travaux sur modèle murin de paludisme cérébral mettent en évidence le rôle des NKT dans l'activation des LT CD4 et l'orientation vers une réponse pro-résolutive, inhibant ainsi le développement du neuropaludisme chez la souris (106). L'étude de cette population cellulaire lors de l'infection palustre chez l'homme est encore très restreinte.

** Les lymphocytes T γ/δ :*

Les lymphocytes T γ/δ sont des LT qui présentent à leur surface le récepteur TCRγ/δ. Ils sont considérés comme des lymphocytes de l'immunité innée car ils sont incapables de reconnaitre les antigènes parasitaires présentés par les CPAg. Les LT γ/δ seraient susceptibles de jouer un rôle dans les réponses immunes innée et acquise. Ces lymphocytes, activés par les différentes cytokines produites par les monocytes, LT et les cellules NK, voient leur population augmenter lors d'une infection palustre à la fois chez l'homme (107) et chez la souris (108) et produisent à leur tour de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNγ (109–111). La sous-population de LT γ/δ appelée TVδ2+, connue pour être majoritaire dans la circulation sanguine, a souvent été associée à la protection palustre (112). En effet, les TVδ2+ ont la capacité de contrôler la parasitémie en sécrétant des facteurs cytosoliques détruisant les GRi et les mérozoïtes présents dans le sang (113, 114). Ce sont également des CPAg permettant ainsi l'activation des LT et le développement de l'immunité acquise (115).

** Le système du complément :*

Le système du complément est constitué d'une vingtaine de protéines à activité enzymatique qui s'activent en cascade afin de répondre à l'infection palustre. Trois voies d'activation sont actuellement décrites, la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. La voie alterne et la voie des lectines ne nécessitent pas la présence d'Ac pour leur activation, et font donc partie de la réponse immunitaire innée, au contraire de la voie classique dépendante des Ac participant à l'immunité acquise. En favorisant la phagocytose des GRi et le développement de la réponse inflammatoire, le système du complément joue un rôle protecteur lors d'une infection palustre. En revanche, s'il est activé de façon excessive, cela peut conduire à un emballement des réponses inflammatoires et à la pathogénicité des formes graves (116).

II-2.1.2/ Régulation de l'immunité innée

L'impact des réponses innées lors d'un paludisme reste encore flou. S'il est évident que ces mécanismes de défense, notamment par la capacité de phagocytose les GRi et la production de cytokines pro-inflammatoires, sont essentiels dans le contrôle de l'infection et l'activation de l'immunité adaptative, il a également été montré qu'un emballement des réponses pro-inflammatoires est associé à la sévérité des accès palustres.

En effet, si les neutrophiles semblent jouer un rôle protecteur au début de l'infection, cette population cellulaire pourrait s'avérer néfaste et contribuer à la physiopathologie du paludisme grave durant les stades plus avancés de l'infection chez l'homme (117). Une étude

a notamment monté que l'augmentation des neutrophiles associée à l'augmentation de leur production de CXCL10 (chimiokine pro-inflammatoire), serait corrélée aux formes de sévères de paludisme y compris le neuropaludisme (118). En sécrétant de fortes quantités de médiateurs pro-inflammatoires, les LT γ/δ pourraient également jouer un rôle délétère lors du neuropaludisme chez l'homme comme chez la souris (119–121). De même, en activant les lymphocytes et principalement les LT CD8 cytotoxiques, les cellules dendritiques joueraient également un rôle dans la pathogénèse du neuropaludisme (122, 123).

Finalement, l'immunité innée joue un rôle de balance, à la fois bénéfique et délétère dans la physiopathologie du paludisme. Sa régulation est donc un des mécanismes essentiel dans la cinétique de résolution de l'inflammation. Cette dernière passe notamment par le développement d'une réponse immunitaire adaptative spécifique contre *Plasmodium*.

II-2.2) Immunité adaptative

L'immunité adaptative est la seconde ligne de défense de l'hôte. Elle conduit à la production d'anticorps spécifiques et la mise en place d'une mémoire immunitaire. Elle fait intervenir les lymphocytes T, responsables de l'immunité à médiation cellulaire, et les lymphocytes B responsables de l'immunité à médiation humorale. Ces lymphocytes arrivent respectivement à maturité dans le thymus et dans la moelle osseuse, pour finalement résider au niveau des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, amygdales, plaques de Peyer) où ils seront activés.

II-2.2.1/ Immunité à médiation cellulaire : rôles des lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) sont caractérisés par la présence du récepteur TCR-2 à leur surface et du cluster de différenciation CD3. On peut les séparer en deux grands groupes : les LT CD4, également appelés LT helper ou auxiliaires et les LT CD8, ou LT cytotoxiques. L'une des fonctions principales des LT est la production de cytokines. Ces dernières sont des glycoprotéines membranaires ou sécrétées, pouvant être pro-inflammatoires (TFNα, IFNγ, IL-1β, IL-6 et IL-12) ou anti-inflammatoires (IL-10 et TGFβ). Elles ont donc la capacité de réguler positivement ou négativement les fonctions des différentes cellules immunitaires mises en jeu lors d'une infection palustre. C'est la sécrétion de cytokines qui déclenche à proprement parler la réponse inflammatoire en activant et recrutant les cellules immunitaires sur les sites d'inflammation. On distingue principalement les interleukines, les chimiokines,

les interférons (IFN), les Tumor Necrosis Factor (TNF) et les Transforming Growth Factors (TGF) (Tableaux 3a et 3b).

a. Les sous-populations de LT

** Les LT CD8 :*

Les LT CD8 sont activés par les CPAg présentant l'antigène parasitaire et les molécules du CMH-I. Des signaux de stimulation et de costimulation permettront ensuite l'activation, puis la multiplication et la différenciation des LT CD8 leur conférant une fonction cytotoxique. Ces LT CD8 cytotoxiques ont donc la capacité de lyser les cellules infectées (hépatocytes, cellules endothéliales, …) *via* la libération de cytokines pro-inflammatoires et de lysosomes comme les granzymes ou les perforines (124, 125). Les GRi ne présentant pas de molécules du CMH ne seront donc pas détruits de cette manière. En revanche, de nombreuses études mettent en évidence le rôle délétère des LT CD8 cytotoxiques et de CXCR3, leur récepteur aux chimiokines, dans la physiopathologie des formes graves de paludisme, principalement du neuropaludisme (124–127). En effet, en produisant du granzyme B, les LT CD8 détruisent les cellules endothéliales formant la barrière hémato-encéphalique, et semblent donc jouer un rôle délétère dans la pathogénèse du paludisme cérébral.

** Les LT CD4 :*

Contrairement aux LT CD8, les LT CD4 reconnaissent l'antigène parasitaire présenté *via* les molécules du CMH-II par les CPAg induisant des signaux secondaires de costimulation. Les LT CD4 vont ensuite se multiplier et se différencier en sous-types de cellules effectrices ou régulatrices en fonction des cytokines produites par les CPAg qui les ont activées (128) (Figure 9).

Les LTh1 obtenus grâce à la sécrétion d'IFNγ et d'IL-12 vont à leur tour produire de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFNγ ou le TNFα. Cette réponse Th1 amplifiera la phagocytose des parasites par les monocytes/macrophages, augmentera leur capacité à produire des ROS et dérivés nitrés, et favorisera la formation des LT CD8 cytotoxiques (129, 130).

Suite à la sécrétion d'IL-27, les LTh1 peuvent évoluer en LTr1 régulateurs produisant la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (131, 132). Les LTr1 inhibent donc la production de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi de ROS et dérivés nitrés par les monocytes/macrophages, participant donc à la protection contre les infections palustres en contrôlant les réponses pro-inflammatoires (133).

Les LT folliculaires (Tfh) obtenus grâce à la production d'IL-6 et d'IL-21 et exprimant fortement le récepteur CXCR5, sont nécessaires au développement des LB et la production d'anticorps spécifiques contre *Plasmodium* (134). Par cette action, ils ont donc un rôle protecteur au cours d'une infection palustre en favorisant l'élimination des parasites et en diminuant la séquestration des GRi (135). Après avoir activés les LB, ces Tfh ont la capacité de se transformer en cellules mémoires circulantes (136) et se diviser en plusieurs sous-types de Tfh ayant des phénotypes et des fonctions différentes (137).

Trois autres sous-populations de LT CD4 sont également décrites mais semblent jouer un rôle mineur lors d'une infection palustre comparé aux LTh1. On peut citer les LTh2 obtenus suite à la production d'IL-4, les LTh17 activés par l'IL-6 et le TGFβ et les LTreg également stimulés par le TGFβ et l'IL-2. Les LTreg sont des LT régulateurs ayant un rôle dans le contrôle de l'inflammation en début d'infection.

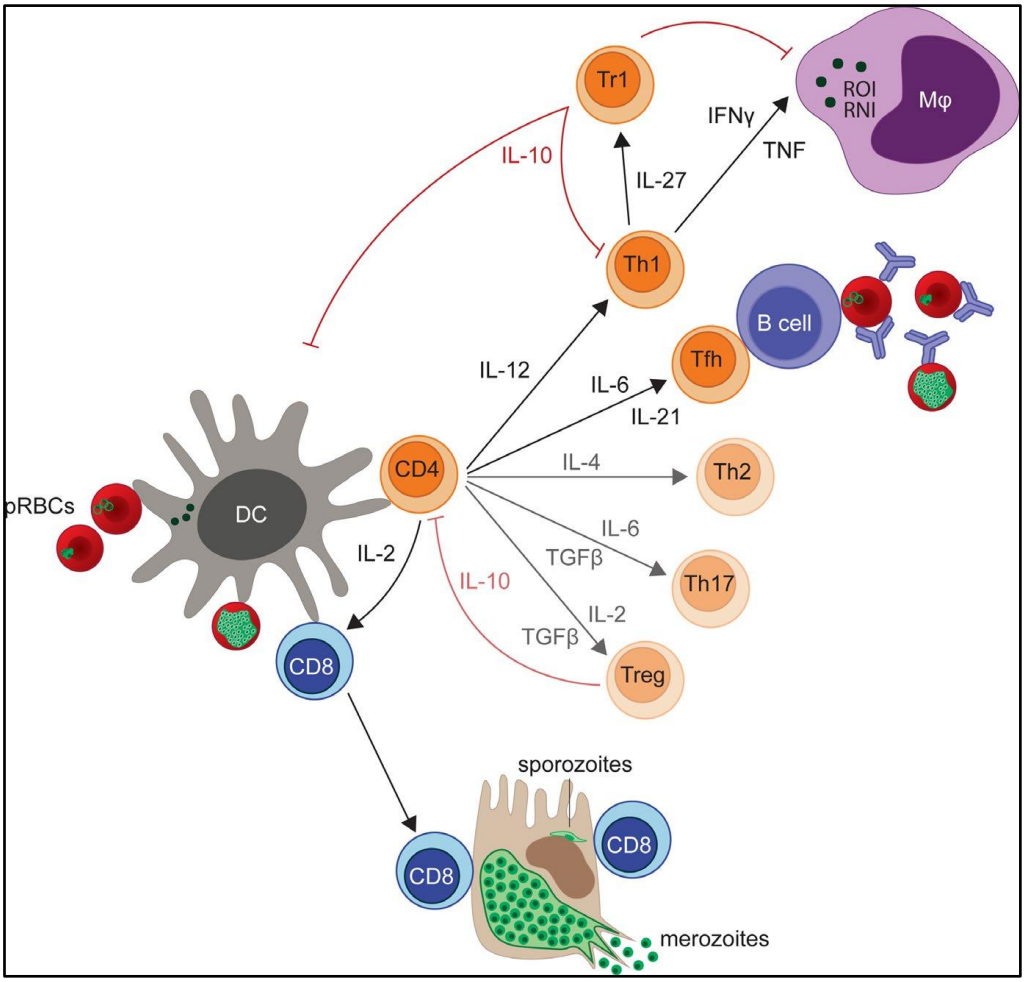


Figure 9 : Activation des différentes sous-populations de LT CD4 au cours d'une infection palustre (source : Kumar *et al*, 2020 (2))

b. Les principales cytokines et leur implication au cours d'une infection palustre :

** Les cytokines pro-inflammatoires :*

L'IFNγ tout comme le TNFα sont des cytokines clés de la réponse immunitaire précoce de l'infection palustre. La sécrétion rapide d'IFNγ est associée à une diminution de la parasitémie et une amélioration clinique à la fois chez l'homme et chez la souris (100, 138). Des travaux ont montré que l'inhibition d'IFNγ contribuait à augmenter la parasitémie et la mortalité chez des souris infectées par *P. chabaudi* (139). De plus, chez l'homme les parasitémies de patients infectés par *P. falciparum* étaient inversement corrélées au niveau d'expression d'IFNγ suggérant un rôle protecteur de l'IFNγ (140–142).

L'IL-12 et l'IL-18 sont deux autres cytokines pro-inflammatoires sécrétées précocement lors d'une infection palustre. Leur production par les monocytes/macrophages activés permet entre autre la différenciation des LT CD4 en LTh1 favorisant la production d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNγ ou le TNFα (143). De plus, des études ont montré que l'expression d'IL-12 était inhibée en cas de paludisme grave confirmant le rôle essentiel de cette cytokine dans la mise en place précoce d'une réponse immunitaire efficace contre *Plasmodium* (143, 144). Tout comme l'IL-12, une diminution de la production d'IL-18 a également été associée au développement d'un paludisme grave chez l'homme (145).

Ainsi, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est augmentée de façon précoce lors d'une infection palustre chez l'homme et chez la souris. Cette réponse inflammatoire est nécessaire à la protection antiplasmodiale. Cependant, une surproduction de cytokines pro-inflammatoires contribue à un emballement de la réponse inflammatoire et à l'aggravation de l'état clinique des patients. Des études ont montré le rôle délétère de l'IL-12 et l'IL-18 dans la physiopathologie du paludisme grave et notamment du neuropaludisme (94, 146–148). De même, des concentrations élevées d'IFNγ sont souvent associées à la gravité palustre chez l'homme comme chez la souris (149, 150). En effet, la production d'IFNγ en fortes quantités contribuerait au paludisme cérébral en favorisant la séquestration des GRi dans les micro-vaisseaux cérébraux, en activant les cellules endothéliales qui exprimeront davantage de molécules d'adhésion (151), et en stimulant le recrutement des LT CD8 cytotoxiques jusqu'au cerveau (127, 150). Le TNFα reste la cytokine la plus souvent associée à la sévérité palustre. Des taux élevés de TNFα dans la circulation périphérique sont corrélés aux formes graves de paludisme et notamment au neuropaludisme (152–155). Dans un modèle expérimental de paludisme cérébral, de fortes concentrations de TNFα ont été retrouvées dans les cerveaux des

souris infectées et sont associés à une surexpression de molécules d'adhésion (ICAM, VCAM), une accumulation des LT CD8 et l'altération de la BHE (156).

** Les cytokines anti-inflammatoires :*

La résolution de l'infection passe par la régulation des réponses pro-inflammatoires essentielles au contrôle de la parasitémie et à l'élimination du parasite avant que le développement excessif et incontrôlé de ces réponses conduise à une détérioration de l'état clinique des formes graves. Cette balance de régulation est notamment possible par la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou le TGFβ par les LT régulateurs (Tfh, Treg) ou encore les monocytes/macrophages, régulant alors les processus inflammatoires déjà mis en place (Tableau 3).

En effet, il a été montré chez la souris que l'absence d'expression d'IL-10 était associée au développement du paludisme grave et à une surmortalité des souris (157, 158) alors que de faibles concentrations d'IL-10 chez l'homme étaient corrélées à la gravité palustre et au décès des patients (159). De même, la surproduction de TGFβ a été associée à une amélioration clinique et la survie des souris (160) alors que son inhibition est corrélée à l'aggravation de la neuroinflammation dans un modèle murin de paludisme cérébral (161).

En revanche, si l'excès de production de cytokines pro-inflammatoires est délétère dans la pathologie palustre, les réponses régulatrices peuvent elles aussi jouer un double rôle et contribuer à la pathogénicité des formes graves (162). En effet, une étude a montré que dans un modèle expérimental de paludisme cérébral (ECM), les souris n'exprimant pas de LTreg survivaient davantage et augmentaient leur production d'anticorps spécifiques à *Plasmodium* (163). Chez l'homme, les LTreg semblent également jouer un rôle dans l'infection palustre. Une étude sur des enfants africains a montré que leur population augmentait au cours d'un paludisme et serait positivement corrélés à l'augmentation de la parasitémie (164). Dans ce sens, les LTr1 semblent inhiber la capacité des cellules dendritiques à présenter l'antigène parasitaire aux LT.

La résolution de l'infection passe donc par un processus de régulation délicat. Le rôle de la balance des cytokines pro- et anti-inflammatoires ainsi que leur cinétique de production semble jouer un rôle crucial.

Tableau 3a : Les principales cytokines impliquées dans le neuropaludisme

	Principales cellules sécrétrices	**Fonctions**	**Implications en clinique**
CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES			
IFNγ	Monocytes, Neutrophiles, NK, LT activés	Active les monocytes, NK et neutrophiles Participe à la séquestration des GRi dans la microcirculation et l'activation des cellules endothéliales	Concentrations augmentées dans le plasma de patients CM et associées à la gravité palustre
TNFα	Monocytes, Neutrophiles, CD	Active les monocytes et les neutrophiles Participe à la séquestration des GRi dans la microcirculation et l'activation des cellules endothéliales	
IL-1β	Monocytes, Neutrophiles, CD	Pyrogène Favorise les réponses pro-inflammatoires Active les LT et LB	
IL-6	Monocytes, LT activés	Contribue à la production d'IgG par les LB	
IL-12	Monocytes, NK, CD, LT activés	Active les NK Réponse lymphocytaire Th1	
CYTOKINES ANTI-INFLAMMATOIRES			
IL-10	Monocytes, LB LT CD4 régulateurs	Inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires, Supprime l'immunité cellulaire, favorise la prolifération des LB	Concentrations diminuées dans le plasma de patients CM et associées à la mortalité
TGFβ		Inhibe la prolifération des LT et LB	

Tableau 3b : Les principales chimiokines impliquées dans le neuropaludisme

	Principales cellules sécrétrices	**Récepteurs**	**Fonctions**	**Evolution de la production lors d'une infection palustre et implication dans la pathologie palustre**
CCL2 (MCP-1)	Monocytes, LT activés, CD, NK	CCR2	Recrutement des monocytes, lymphocytes et cellules NK sur les sites inflammatoires Active les neutrophiles	Concentrations augmentées dans le plasma de patients CM et dans les cerveaux de souris lors d'un ECM
CCL3 (MIP-1α)		CCR1, CCR5	Recrutement des monocytes et cellules NK sur les sites inflammatoires Impliqué dans l'activation des LT par les CD	Concentrations augmentées dans le plasma de patients CM et dans les cerveaux de souris lors d'un ECM De faibles concentrations dans le cerveau associées à la protection palustre lors d'un ECM
CCL4 (MIP-1β)		CCR5		Concentrations augmentées dans le plasma et le LCR de patients CM et associées à la mortalité, concentrations augmentées dans les cerveaux de souris lors d'un ECM De faibles concentrations dans le cerveau associées à la protection palustre lors d'un ECM
CCL17	LT activés CD	CCR4	Réponse des LT CD4 (Th2 et T régulateurs), migration des LTh2 et LT régulateurs	
CCL22				
CXCL5	Neutrophiles	CXCR1, CXCR2	Migration des neutrophiles	
CXCL8 (IL-8)	Monocytes, Neutrophiles			Concentrations augmentées dans le plasma et le LCR de patients CM et associées à la mortalité
CXCL9 (MIG)	LT activés, Monocytes, NK, Neutrophiles	CXCR3	Réponse lymphocytaire Th1 Migration des LT Th1, LT CD8 et NK	Concentrations augmentées dans le plasma de patients CM et dans les cerveaux de souris lors d'un ECM Les souris CXCL9-/- partiellement protégées d'un ECM
CXCL10 (IP-10)				Concentrations augmentées dans le plasma et le LCR de patients CM et associées à la mortalité, concentrations augmentées dans les cerveaux de souris lors d'un ECM Les souris CXCL10-/- protégées d'un ECM, développent moins de neuroinflammation et présentent une DP périphérique réduite
CX3CL1 (Fractalkine)	Monocytes, LT activés, NK	CX3CR1	Migration des monocytes, NK, et LT	Concentrations diminuées dans le plasma de patients CM

II-2.2.2/ Immunité à médiation humorale : rôle des lymphocytes B

L'homme ne développe jamais d'immunité totale pour le paludisme. Cependant, avec l'âge, et à force d'expositions régulières au parasite, les populations vivant dans des zones de forte endémicité palustre développent une certaine immunité protectrice, acquise et partielle, face au parasite, on appelle cela la prémunition. Cette dernière s'acquiert au bout de plusieurs années d'exposition et dépend des espèces plasmodiales et de la fréquence des piqûres (44, 165). Elle n'empêche pas de contracter la maladie mais permet à l'organisme de lutter plus rapidement et plus efficacement contre l'infection et ainsi de développer des formes palustres moins graves. Cette prémunition disparait lors d'un arrêt de l'exposition aux piqûres. Le risque est donc important pour les émigrés ayant effectués un séjour hors d'une zone endémique (1 à 2 ans) et qui reviennent dans une zone de transmission palustre. De même, les enfants âgés de 6 mois à 6 ans n'ont pas encore développé cette immunité acquise et sont donc plus vulnérables aux accès palustres graves (43). Les nouveau-nés sont quant à eux protégés par les anticorps maternels durant les 6 premiers mois de leur vie. Enfin, durant la grossesse, la prémunition est partiellement perdue.

La prémunition met en évidence le rôle essentiel de la réponse humorale et des lymphocytes B (LB) face à l'infection. Outre leur fonction de CPAg, les LB sont responsables de la production d'anticorps contre les différents pathogènes de l'organisme. Les LB se différencieront soit en plasmocytes qui sécréteront des Ac solubles se fixant à l'Ag facilitant donc la phagocytose opsonique dépendante des Ac, soit en LB mémoires qui présenteront à leur surface des Ac spécifiques permettant une réponse plus rapide et efficace en cas de seconde infection. Les Ac produits sont des immunoglobulines (Ig) différenciées selon 4 classes. On retrouve les IgM produites précocement et disparaissant rapidement au cours de l'infection (166), les IgG constituant la classe majoritaire et produites tout au long de l'infection, ainsi que les IgA et les IgE.

Si une large majorité des Ac produits ne sont pas spécifiques au parasite, environ 5% d'entre eux vont cibler spécifiquement les Ag parasitaires de *Plasmodium* et principalement ceux situés à la surface du GRi. Ces Ag possèdent une grande variabilité génétique permettant ainsi au parasite d'échapper aux réponses immunitaires de l'hôte. Les protéines les plus étudiées sont la *Pf*EMP1 impliquée dans la cytoadhérence des GRi, la protéine Rifin qui serait responsable du phénomène de rosetting, les protéines de surface du mérozoïte (MSP-1, 2 et 3) jouant un rôle essentiel lors de l'invasion des GR par le parasite, et le circumsporozoïte (CSP)

retrouvé à la surface des sporozoïtes et favorisant la cytoadhérence du parasite aux cellules hépatiques ou stomacales du moustique (24).

Ainsi, les Ac jouent un rôle majeur dans la résolution de l'infection palustre. En effet, des travaux effectués sur des souris déficientes en LB ont prouvé qu'à la suite d'un transfert passif d'Ac spécifiques de *Plasmodium*, les souris étaient capables de mieux éliminer le parasite. Un transfert adoptif de LB permettait en outre d'orienter la réponse immunitaire Th1 vers une réponse plutôt régulatrice, essentielle à la résolution de l'infection (167, 168). Chez l'homme, des expériences ont montré qu'un transfert d'IgG à des enfants atteints de paludisme conduisait à une diminution de leur parasitémie et une amélioration clinique (169). De plus, il a été montré que les Ac spécifiques de la protéine parasitaire *Pf*EMP1 permettent de limiter l'éclatement des GRi et la dissémination des parasites, mais également de supprimer leur séquestration dans la microcirculation (170). Si des travaux montrent que de fortes concentrations d'Ac sont directement corrélées à une meilleure protection face au *Plasmodium* (171), le type d'immunoglobulines mises en place semble être encore plus important. Par exemple, les IgG1 et IgG3, ciblant les protéines MSP2 et MSP3, jouent un rôle dans le mécanisme d'opsonisation nécessaire à la phagocytose des GRi par *P. falciparum* et la résolution de l'infection (172–175). En revanche les IgG2 et IgG4 ont la capacité de bloquer cette opsonisation et joueraient donc un rôle délétère dans la physiopathologie du paludisme chez l'homme (176–178). Un taux élevé d'IgE a également été corrélé à une mauvaise évolution clinique et la gravité palustre (179, 180) notamment à cause de leur liaison à des récepteurs cibles de la réponse pro-inflammatoire (181). Chez la souris, les IgG 1, 2 et 3 ont également prouvé leur efficacité face à l'infection palustre en améliorant l'élimination des parasites par la phagocytose opsonique des GRi par les monocytes/macrophages.

Les Ac peuvent agir à de multiples niveaux : 1/ directement sur les Ag parasitaires, (comme MSP1) empêchant alors l'adhésion et/ou l'internalisation du parasite dans le GR (182), 2/ en perturbant le développement du parasite à l'intérieur du GR via des transporteurs, 3/ en agissant avec d'autres éléments du système immunitaire, notamment les monocytes/macrophages ayant la capacité de phagocyter les GRi, 4/ en limitant la séquestration et l'accumulation des GRi dans les organes profonds, phénomène notamment observés lors d'un neuropaludisme, 5/ en se fixant directement sur les Ag parasitaires, bloquant donc la production de cytokines pro-inflammatoires notamment du TNFα (183). Malgré leurs actions essentielles à la bonne résolution de l'infection, la grande variabilité génétique de *Plasmodium* rend particulièrement complexe la recherche de stratégies thérapeutiques basées sur les Ac ciblant les Ag parasitaires et la mise au point d'un vaccin.

Finalement, des réponses immunitaires innées et acquises travaillent de concert et sont étroitement liées lors d'une infection palustre. Leur régulation est donc un des points fondamental de la résolution de l'infection et de l'inflammation associée. La compréhension de la chronologie des évènements, l'activation et le rôle des populations cellulaires ainsi que la cinétique de production des différents médiateurs pro- et anti-inflammatoires reste encore une thématique essentielle dans l'étude des mécanismes physiopathologiques conduisant aux formes graves de paludisme et notamment de neuropaludisme.

De plus, avec le temps et les infections répétées, l'infection palustre modifie les proportions des différentes populations de cellules immunitaires et leurs propriétés phénotypiques. Ces changements sont corrélés au devenir clinique des patients et semblent être des marqueurs de leur l'état immunitaire. En effet, chez l'homme un faible ratio monocyte/neutrophiles a été associé à la gravité palustre, alors que le ratio monocytes/lymphocytes est positivement corrélé à la parasitémie et à la sévérité de l'infection (184–187). De plus, le ratio monocyte/lymphocyte semble être un marqueur prédictif de l'efficacité thérapeutique du vaccin RTS,S actuellement le plus avancé (188).

Dans ce contexte, les monocytes/macrophages jouent un rôle majeur à l'interface entre les réponses immunitaires innées et acquises (Figure 10). Le chapitre suivant précisera donc en détail les caractéristiques de cette population et son rôle complexe dans la physiopathologie du neuropaludisme.

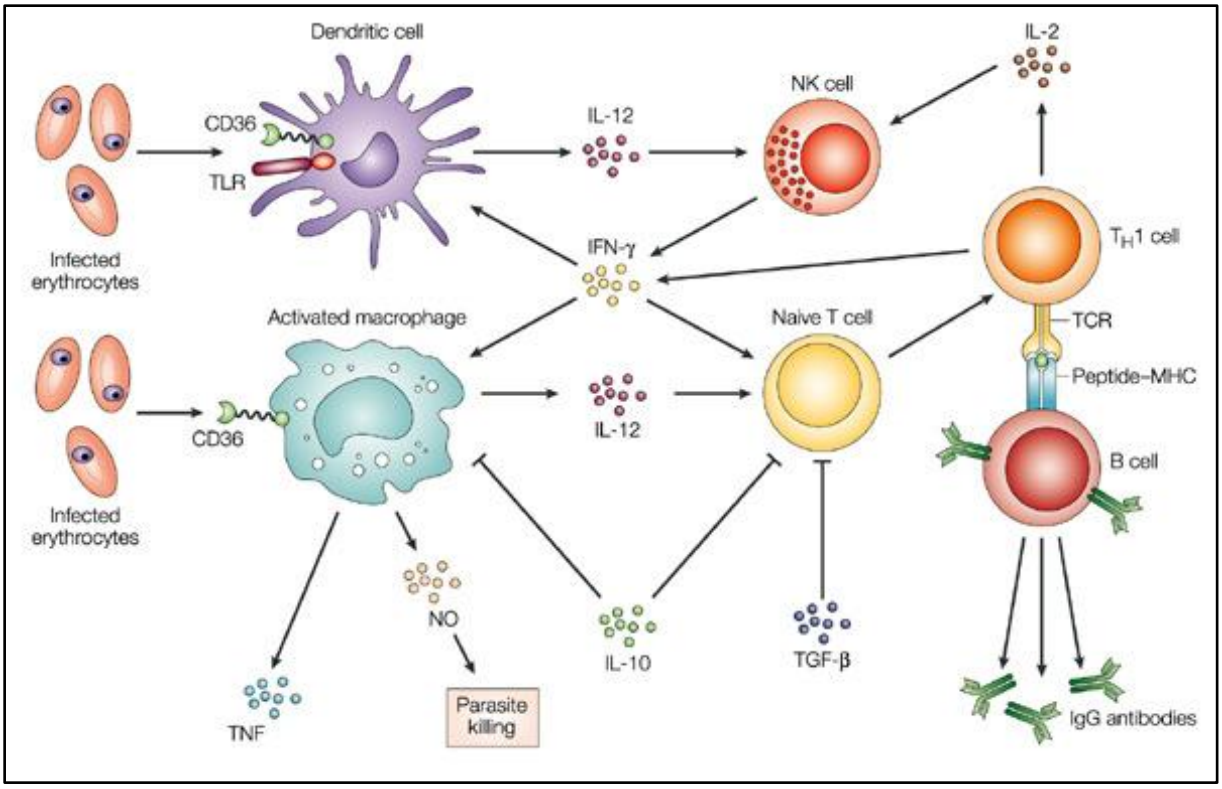


Figure 10 : Lien entre immunité innée et acquise lors d'une infection palustre (source : Stevenson *et al*, 2004 (3))

II-3. Rôles des monocytes/macrophages dans la physiopathologie du neuropaludisme

Les monocytes/macrophages sont connus pour être des cellules extrêmement plastiques. Leurs variabilités phénotypique et fonctionnelle leur permettent de s'adapter à leur environnement en fonction des différents signaux qu'ils perçoivent et l'expression à leur surface de multiples récepteurs leur permettant d'interagir avec de nombreuses cellules immunitaires et des pathogènes comme *Plasmodium* (189). Ainsi, le microenvironnement a un rôle crucial dans le recrutement, l'état d'activation des monocytes/macrophages (appelé polarisation) et leurs fonctions. Ils peuvent promouvoir à la fois une réponse pro- ou anti-inflammatoire et donc être impliqués dans les mécanismes de l'inflammation comme de sa résolution. Lors d'une infection palustre, les monocytes/macrophages ont rôle majeur dans l'élimination des parasites à travers leur mécanisme de phagocytose, leur capacité à produire un grand nombre de médiateurs pro- et anti-inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNI). Ils sont donc des acteurs clés de la réponse inflammatoire et de sa résolution au cours du neuropaludisme (190). Parallèlement, ils peuvent également jouer un rôle délétère

dans la pathogénicité palustre (190). L'étude de cette balance entre protection et pathogénèse constitue le centre de mon travail de thèse.

II-3.1) Origine et différenciation

L'origine des monocytes se situe dans la moelle osseuse hématopoïétique. Une cellule souche hématopoïétique pourra se différencier en cellule souche lymphoïde, donnant par la suite les LT et LB, ou en cellule souche myéloïde qui se différenciera en divers progéniteurs de cellules myéloïdes formant ainsi les globules rouges, les plaquettes, les polynucléaires et les monocytes (Figure 11). La différenciation des monocytes est dépendante du facteur de croissance M-CSF (Macrophage-Colony Stimulationg Factor) et dont le récepteur correspondant est retrouvé à la surface des monocytes/macrophages (191, 192). Les monocytes passent ensuite dans le sang périphérique où ils y resteront quelques jours. Chez l'homme ces monocytes circulants représentent environ 10% des leucocytes contre environ 4% chez la souris (191). Il a été démontré qu'à la suite d'une inflammation, la moelle osseuse induisait une monocytopoïèse se traduisant par une augmentation des monocytes dans le sang (193).

Par la suite, les monocytes pourront se différencier en cellules dendritiques ou migrer vers différents tissus de l'organisme où ils deviendront des macrophages résidents (194). Ces macrophages changeront de nom en fonction du tissu dans lequel ils résident (microglie dans le cerveau, cellules de Kupffer dans le foie, …) Ces derniers se différencient des monocytes circulants par leur plus grande taille et le développement de leur système vacuolaire.

Leur localisation ubiquitaire dans l'organisme, que ce soit les monocytes dans le sang circulant ou les macrophages dans les tissus profonds, leur permet d'être des acteurs précoces et efficaces dans la lutte contre les parasites de *Plasmodium* (190, 195). Leur mobilité, leur fonction de phagocytose, et leur capacité à produire une grande variété de médiateurs pro- et anti-inflammatoires en font les cellules clés de l'homéostasie tissulaire.

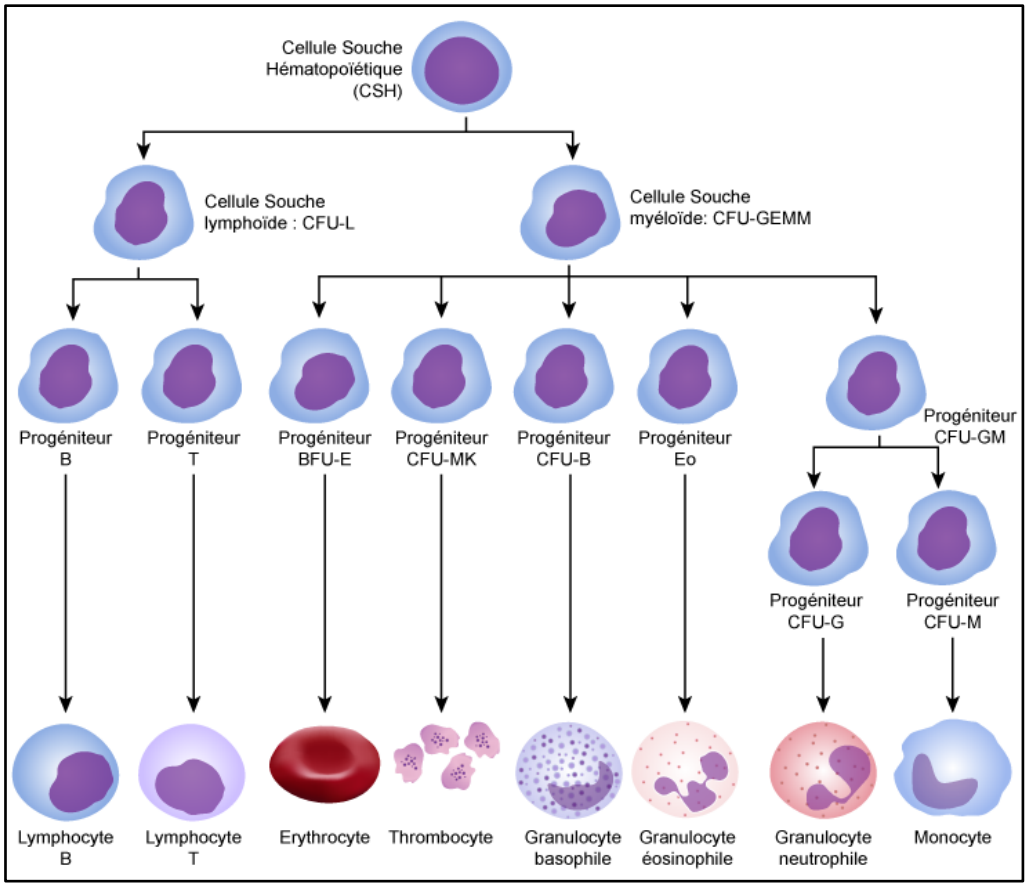


Figure 11 : Origine des différentes cellules hématopoïétiques (source : Soins-Infirmiers.com)

II-3.2) Classification et hétérogénéité des monocytes/macrophages

Les monocytes sont des cellules possédant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles très hétérogènes permettant d'établir une classification en trois différentes sous-populations monocytaires. De même, les macrophages sont également discriminés en différents sous-types dépendants de leur polarisation. Ces deux classifications restent encore de nos jours extrêmement complexes et sujet de débats.

II-3.2.1/ Les trois sous-populations de monocytes

a. <u>Description générale des sous-populations :</u>

** Chez l'homme :*

La classification des monocytes a été établie en fonction de leur niveau d'expression des marqueurs CD14 et CD16. Ainsi on distingue trois sous-populations : les monocytes classiques dits inflammatoires ($CD14^+$ $CD16^-$), les monocytes intermédiaires ou

phagocytaires ($CD14^+$ $CD16^+$) et les monocytes non-classiques considérés comme patrouilleurs et réparateurs ($CD14^-$ $CD16^+$) (Tableau 4) (5, 196).

L'origine de la différenciation des trois sous-populations de monocytes doit encore être étudiée et clarifiée. Le modèle d'interprétation actuel propose que les monocytes classiques libérés de la moelle osseuse circulent dans le sang environ 24h avant d'être soit recrutés dans les différents tissus de l'organisme pour devenir des macrophages résidents, soit se convertir en monocytes intermédiaires et en non-classiques dans la circulation sanguine (196–198). Cette explication est notamment soutenue par des études d'épigénétique qui ont permis d'identifier différents marqueurs chez les monocytes classiques, comme le facteur de transcription NR4A1, qui semblent nécessaires à leur conversion vers un profil non-classique, mais également par l'observation précoce de la population de monocytes classiques et plus tardive de non-classiques (192, 199). Dans le cerveau, leur différenciation en macrophages (appelés microglie), reste sujet à débat et semble dépendante des conditions physiopathologiques (200, 201). De plus, cette théorie n'exclut pas le fait qu'une partie des monocytes intermédiaires et non classiques pourrait se développer à partir de progéniteurs distincts et ne serait donc pas issue d'une différenciation des monocytes classiques (192).

La caractérisation des sous-populations de monocytes ne cesse d'évoluer et certains travaux récents remettent en cause cette classification en 3 sous-populations (199, 202–205). Une étude a notamment conduit à l'identification de 8 sous-types de monocytes caractérisés par différents marqueurs de surface, mettant en évidence l'hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des monocytes au sein même d'une sous-population (202). Cette hétérogénéité pourrait cependant expliquer pourquoi certains monocytes classiques se transforment en monocytes intermédiaires et non-classiques alors que d'autres infiltrent des tissus de l'organisme et deviennent des macrophages résidents.

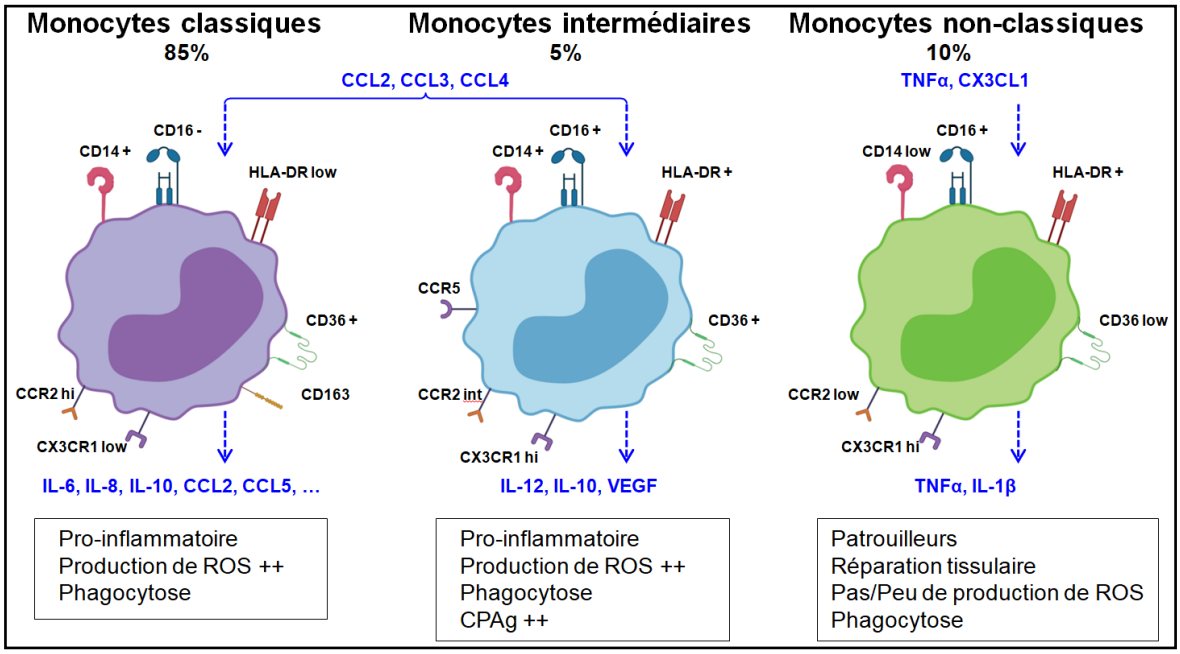
A l'état physiologique, les monocytes classiques sont la sous-population majoritairement présente dans la circulation sanguine, représentant environ 80 à 90% des monocytes. Ces monocytes se développent à la suite de signaux pro-inflammatoires comme la sécrétion des chimiokines CCL2, CCL3 et CCL4 (198). A leur tour, ils sécrèteront de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, CCL2, CCL3 et CCL5 (206). Les monocytes classiques semblent plus impliqués que les monocytes intermédiaires dans la production de ROS (207). De plus, ces cellules expriment à leur surface différents récepteurs aux chimiokines et notamment le CCR2 (récepteur aux chimiokines CCL2 et CCL3) traduisant leur capacité à migrer vers les sites inflammatoires (196). Les monocytes classiques

pourront ainsi se polariser en macrophages M1 pro-inflammatoires dont nous parlerons dans le prochain point.

A l'état physiologique, les monocytes intermédiaires sont les moins représentés des 3 sous-populations de monocytes. Tout comme les monocytes classiques, ils expriment à leur surface différents récepteurs aux chimiokines leur permettant de migrer vers les sites inflammatoires, principalement le récepteur CCR5 majoritairement exprimé dans cette population (206). De plus, ils présentent une capacité de phagocytose équivalente aux monocytes classiques, mais expriment moins de molécules d'adhésion (208). Ces cellules ont également un rôle important en tant que CPAg dans l'activation des LT (206). Les monocytes intermédiaires sécrètent des cytokines inflammatoires comme le TNFα, l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-12 ou le CCL3 (206), mais semblent également capables de produire de l'IL-10 (209). Enfin, ils présentent une forte capacité à produire des ROS soulignant leur propriété microbicide (208).

Les monocytes non-classiques seraient issus de la maturation de certains monocytes classiques, et de leur stimulation par différentes cytokines comme le TNFα ou la fractalkine (CX3CL1), ligand du récepteur CX3CR1 (192, 198). Cette population présente une expression plus faible de CCR2, et CD11b et une expression plus forte de CD45 et HLA-DR que les monocytes classiques (196). De plus, les monocytes non-classiques ne produisent pas ou peu de ROS. En revanche, lors d'infections virales, ils peuvent sécréter différentes cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα, l'IL-1β ou la chimiokine CCL3 bien que cette production soit largement minoritaire comparée à celle des monocytes classiques (210). Les monocytes non-classiques circulent dans les vaisseaux sanguins, d'où leur nom de patrouilleurs. Ces cellules phagocytent les cellules lysées ou apoptotiques et autres débris, et participent à la réparation tissulaire lors de phénomènes inflammatoires (211). Ils pourront ainsi être recrutés dans les différents tissus de l'organisme et se polariser en macrophages M2 anti-inflammatoires dont nous parlerons ultérieurement.

Tableau 4 : Les trois sous-populations de monocytes chez l'homme et leurs principales caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles



** Chez la souris :*

Une classification identique en trois sous-populations a également été décrite suivant le niveau d'expression du marqueur Ly6C. On retrouve les monocytes Ly6C^{hi} (CCR2^{hi} CX3CR1^{low}), les monocytes Ly6C^{int} et monocytes Ly6C^{low} (CCR2^{int} CX3CR1^{hi}) (196, 199). Chacune des trois sous-populations possède des fonctions particulières relativement identiques entre l'homme et la souris, les monocytes classiques correspondent donc aux Ly6C^{hi}, les monocytes intermédiaires aux Ly6C^{int} et les non-classiques aux Ly6C^{low} (207). De plus, les macrophages résidents du cerveau, ou microglie (CCR2^{low} CX3CR1^{hi}) représentent à l'état physiologique la population majoritaire de monocytes/macrophages dans ce tissu et n'expriment pas de molécule du CMH-II (212).

Si une corrélation entre les différentes sous-populations de monocytes murins et humains est souvent acceptée, certaines différences méritent d'être discutées. Chez l'homme, l'ensemble des populations monocytaires exprime le marqueur HLA-DR, alors que les molécules du CMH ne sont pas exprimées par toutes les populations monocytaires chez la souris (192). De plus, les monocytes Ly6C^{low} sont la sous-population exprimant majoritairement le récepteur CD36 contrairement aux monocytes humains où il est principalement exprimé par les monocytes classiques (207). L'implication de ce récepteur dans la phagocytose des GRi lors d'une infection palustre est clairement décrite et nous y reviendrons dans un autre paragraphe. De plus, les proportions entre les différentes sous-populations de monocytes sont différentes

entre l'homme et la souris. En effet, si chez l'homme les monocytes classiques constituent la grande majorité des monocytes sanguins, ils représentent environ la moitié du pourcentage de monocytes chez leurs équivalents murins.

b. Implication des sous-populations dans la pathologie palustre :

Le rôle délétère des monocytes inflammatoires a déjà été reporté dans de nombreuses pathologies comme l'athérosclérose (213), l'obésité (214), ainsi que dans d'autres maladies parasitaires, comme la toxoplasmose et la leishmaniose (215, 216), ou neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (217). D'autres études ont mis en évidence l'implication des monocytes intermédiaires et non-classiques lors d'infections bactériennes (sepsis, tuberculose) (218, 219), virales (VIH, dengue, hépatite B) (220–222), et lors de maladies inflammatoires (asthme, AVC) (223, 224). Cependant, la caractérisation phénotypique et fonctionnelle ainsi que la compréhension du rôle des trois sous-populations monocytaires dans le cadre d'une infection palustre sont encore peu étudiées et sont au centre de mon travail de thèse. Ce paragraphe synthétise les travaux récents menés à la fois chez l'homme et chez la souris et met en évidence la nécessité d'étudier plus précisément l'implication de ces sous-populations dans la pathologie palustre.

** Chez l'homme :*

Des travaux menés sur des adultes atteints de paludisme simple à *P. falciparum* ont montré que le nombre (ou pourcentage) de monocytes classiques et intermédiaires augmente lors de l'infection dans la circulation périphérique (225, 226). En fonction des études, la proportion de monocytes non-classiques semble quant à elle augmenter (227, 228) ou ne pas évoluer (226). De plus, l'expression de HLA-DR, récepteur impliqué dans la présentation de l'antigène parasitaire, et l'activation des LT, est augmentée à la surface des trois sous-populations monocytaires, ainsi que celle du récepteur CD16 sur les monocytes intermédiaires (225–227). Une étude similaire sur des enfants atteints de paludisme simple à *P. falciparum* a permis de confirmer l'augmentation du nombre de monocytes intermédiaires au cours de l'infection (186). Cette population exprimera alors moins de CD36 à sa surface (186).

Une autre étude effectuée par Antonelli *et al*, sur des adultes infectés par *P. vivax,* a montré que la population de monocytes classiques présente dans la circulation périphérique augmente au cours de l'infection contrairement aux monocytes intermédiaires et non-classiques dont les proportions ne semblent pas évoluer (229). L'expression du marqueur HLA-DR est également augmentée à la surface des monocytes classiques, et ne semble pas être modifiée chez les

deux autres populations, bien que les monocytes intermédiaires soient ceux qui l'expriment le plus. Cette étude révèle que les monocytes classiques produisent de façon précoce de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-6, IL-8), puis migrent vers les sites inflammatoires de manière CCR2-dépendante. Les monocytes intermédiaires sécrètent également de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires ainsi que de l'IL-10. Lors de l'infection, l'expression de molécules d'adhésion, comme ICAM ou VCAM, et de récepteurs aux chimiokines, augmente sur cette population cellulaire. Les monocytes intermédiaires semblent aussi être la population la plus efficace dans la phagocytose des GRi par *P. vivax* en sécrétant de larges quantités de TNFα et de ROS intracellulaires avec notamment une augmentation de la p47-phox (composant de la NADPH-oxydase). Les monocytes intermédiaires semblent donc jouer un rôle clé dans l'élimination du parasite et le contrôle de l'infection palustre à *P. vivax* (229).

Dans le même sens, une étude effectuée *in vitro* a montré que les monocytes intermédiaires étaient la population la plus efficace dans la phagocytose opsonique des GRi par *P. falciparum* et dans la production de TNFα (230). Comme nous le discuterons ultérieurement, cette phagocytose dépend de l'expression du récepteur CD16 à la surface des monocytes, qui reconnait les GRi opsonisés par des Ac ou molécules du complément. Cependant, cette étude révèle que la phagocytose des GRi ne semble pas dépendre uniquement de CD16 mais également de la présence de récepteurs du complément tels que CR3 (CD11b) ou CR4 (CD11c) présents à la surface des monocytes intermédiaires. Les monocytes non-classiques n'exprimant pas ces récepteurs ne semblent donc pas avoir la capacité de phagocyter les GRi de manière opsonique malgré l'expression de CD16 (230). Ainsi, cette étude met en évidence de rôle majeur des monocytes intermédiaires dans la phagocytose opsonique des GRi et des mérozoïtes dont nous reparlerons plus tard.

Enfin, une dernière étude menée par Ogonda *et al*, a porté sur le rôle des monocytes non-classiques chez des enfants atteints de différentes formes cliniques de paludisme à *P. falciparum* : paludisme simple (UM), anémie sévère palustre (SMA) et neuropaludisme (CM) (231). Ils ont montré que les monocytes non classiques exprimaient plus de CD16 dans le groupe SMA par rapport au groupe CM et UM. Cette augmentation était associée à la production intracellulaire de TNFα par les monocytes non-classiques et inversement corrélée au taux d'hémoglobine. Ce résultat suggère que cette sous-population pourrait jouer un rôle primordial dans la lutte contre *P. falciparum*, mais contribuerait également à la physiopathologie de l'anémie sévère palustre chez l'enfant.

** Chez la souris :*

L'équipe de Sponaas *et al* a décrit dans les rates de souris infectées par *P. chabaudi* (induisant un paludisme non létal dans leur modèle), l'apparition relativement tardive d'une population de monocytes inflammatoires $CD11b^{+}$ $Ly6C^{hi}$ originaire de la moelle osseuse et qui aurait migrée vers la rate de façon CCR2-dépendante (232). Cette population produit des cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-6) ainsi que des ROS, et régule à la hausse la NO-synthase (NOS), responsable de la synthèse d'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$). Ce phénomène conduit à la phagocytose des GRi et participe donc à l'élimination de *Plasmodium* et au contrôle de la parasitémie. De plus, les monocytes $Ly6C^{hi}$ expriment de faibles niveaux d'expression de CMH-II traduisant un défaut dans leur fonction de CPAg et donc dans l'activation des LT (232).

D'autres études effectuées sur un modèle murin expérimental de paludisme cérébral (ECM) ont observé dans la circulation sanguine une augmentation de la proportion de monocytes $Ly6C^{hi}$ et une diminution de celle des $Ly6C^{low}$ (233). Parallèlement, les proportions des populations $Ly6C^{hi}$ (212) et $Ly6C^{int}$ (234) sont augmentées dans la rate des souris infectées, possédant une forte activité de phagocytose. Ces cellules $Ly6C^{hi}$ peuvent se différencier en cellules dendritiques appelées MO-DC ($F4/80^{+}$ CMH-II^{+} $CCR5^{+}$ $CXCL9^{+}$ $CXCL10^{+}$) de manière IFNγ-dépendante (235). Les monocytes $Ly6C^{hi}$ et les MO-DC ont la capacité de migrer jusqu'au cerveau *via* l'expression de nombreux récepteurs aux chimiokines où ils sur-expriment les molécules du CMH-II traduisant une augmentation de leur état d'activation et de la présentation antigénique, favorisant entre autre l'activation des LT et la production d'IFNγ (234, 235). Les monocytes $Ly6C^{hi}$ sont la population de leucocytes majoritairement séquestrés dans les micro-vaisseaux cérébraux où leur accumulation est observée 1 à 2 jours avant l'apparition des symptômes neurologiques (233). Cependant, si ces études mettent en évidence l'implication des monocytes $Ly6C^{hi}$ dans la physiopathologie du neuropaludisme en contribuant à la neuroinflammation et au recrutement de cellules immunitaires dans le cerveau, leur rôle est dépendant d'une autre population cellulaire, les LT CD8. En effet, il semblerait qu'il y ait une régulation entre les monocytes $Ly6C^{hi}$ et les LT CD8+ cytotoxiques (233). En absence de monocytes, on observe moins de LT CD8 dans le cerveau des souris et parallèlement, le recrutement des LT CD8 semble nécessaire à l'adhérence des monocytes $Ly6C^{hi}$ aux micro-vaisseaux, leur diapédèse dans le cerveau, et l'induction d'un paludisme cérébral.

Toujours dans un modèle murin d'ECM, d'autres travaux ont montré que la population de monocytes $Ly6C^{hi}$ (236) mais également et principalement celle des $Ly6C^{low}$, augmentent à la

fois dans le cerveau et les poumons des souris infectées (212, 237). En exprimant CCR2, les monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{low} semblent bien avoir été libérés de la moelle osseuse de manière CCR2-dépendante pour être recrutés jusqu'aux poumons et au cerveau où ils participeront à la phagocytose des GRi notamment via leur récepteur CD36 (236), mais où ils favoriseront également l'activation des LT via l'expression des molécules du CMH-II (212, 236, 237). Niewold *et al* montrent également que les monocytes Ly6C^{hi} pourraient se convertir vers un phénotype de monocytes Ly6C^{int} puis Ly6C^{low}. De plus, les monocytes Ly6C^{hi} présents dans la circulation sanguine et ayant phagocytés des microparticules immunomodulatrices (IMP pour « immune-modifying microparticules ») ne sont plus capables de migrer, s'accumuler et se différencier en Ly6C^{low} dans les cerveaux et les poumons des souris qui ne développeront donc pas de neuropaludisme (212).

En conclusion, il semble essentiel de prendre en considération l'hétérogénéité des populations monocytaires et de leurs multiples fonctions à la fois chez l'homme et chez la souris. Les travaux menés jusqu'à présent ont essentiellement décrit le rôle des monocytes Ly6C^{hi} dans l'infection palustre, alors que le rôle des autres populations est moins clair. Des études sont encore nécessaires pour mettre en évidence l'implication de chacune des sous-populations dans la pathologie palustre et pourraient contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques observés au cours du neuropaludisme. Mes travaux de recherche se sont donc intéressés à la caractérisation précise de ces sous-populations de monocytes au cours d'une infection palustre à la fois chez l'homme et chez la souris afin de mieux identifier leur rôle respectif et leur impact dans la balance protection/pathogénèse.

II-3.2.2/ La polarisation M1/M2 des macrophages

La classification des macrophages en fonction de leur polarisation reste encore de nos jours extrêmement complexe. En 2003, Gordon propose de les diviser en deux sous-types (238) : les macrophages M1 pro-inflammatoires induisant une réponse de type Th1, et les macrophages M2 anti-inflammatoires induisant une réponse pro-régulatrice. De nombreux travaux ont depuis montré les limites de cette classification (239, 240). En 2008, Mosser et Edwards ont ainsi défini une nouvelle classification permettant de mieux prendre en compte la différence d'expression de récepteurs et de fonctions identifiées dans ces deux sous-types (241).

** Les macrophages M1 :*

La polarisation en macrophages M1 dits pro-inflammatoires nécessite la présence d'IFNγ, TNFα et de stimuli pathogènes tels que le LPS (lipopolysaccharide) (242). A leur tour, ils sécrèteront de larges quantités de cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα ou l'IL-12 et présenteront une forte expression des molécules du CMH-II, activant alors les réponses immunitaires innée et acquise (241). Les macrophages M1 jouent un rôle essentiel dans la clairance parasitaire mais contribuent également à la gravité de l'infection palustre en participant à la réponse pro-inflammatoire (243). De plus, il semblerait qu'une polarisation M1 soit associée à une diminution de l'expression du récepteur CD36 à la surface des monocytes. En effet, des travaux ont montré que le TNFα a la capacité de limiter l'expression de CD36 à la surface des monocytes humains (244), suggérant une capacité moindre de ces monocytes à phagocyter les parasites *via* CD36. Cependant, Berry *et al* ont montré que les monocytes issus de patients impaludés présentent à la fois une expression réduite de CD36 à leur surface et une capacité moindre à sécréter de TNFα (245). Cette capacité limitée à produire du TNFα était liée à la présence de facteurs parasitaires solubles. Ces résultats illustrent la complexité des phénotypes et fonctions des macrophages que la catégorie « M1/M2 » ne permet pas toujours de refléter. Les macrophages M1 peuvent également sécréter de grandes quantités de ROS et de dérivés nitrés, comme le $NO^{\cdot}$ augmentant la destruction du parasite ingéré.

** Les macrophages M2 :*

Les macrophages M2 dits anti-inflammatoires produisent des cytokines anti-inflammatoires permettant de réguler les propriétés pro-inflammatoires des macrophages M1. Ils peuvent être divisés en quatre sous-ensembles : M2a, M2b, M2c, M2d (189).

Les macrophages M2a sont polarisés suite à la sécrétion de cytokines régulatrices telles que l'IL-4 et l'IL-13 se fixant sur les récepteurs à la surface des macrophages (245, 246). Ils favorisent la reconnaissance des agents pathogènes en augmentant l'expression des molécules du CMH-II, et jouent également un rôle dans le processus de réparation tissulaire en stimulant une réponse immunitaire régulatrice. Les M2a sont aussi caractérisés par une forte expression du récepteur scavenger CD36 impliqué dans la phagocytose des cellules infectées tels que les GRi par *P. falciparum*, des cellules apoptotiques et autres débris à éliminer (245, 247). Cette phagocytose de *Plasmodium via* le CD36 sera détaillée dans un des paragraphes suivants. De plus, l'activation des M2a semble mettre en jeu des médiateurs lipidiques issus du métabolisme de l'acide arachidonique tels que les prostaglandines (245, 248), *via* la

surexpression de différentes enzymes comme la 5-lipoxygénase (5-LOX) ou la 12/15-lipoxygénase (12/15-LOX) (248–250). Enfin, une étude a montré que les monocytes M2a contribuent à la protection palustre dans un modèle d'ECM par leur capacité à phagocyter les GRi mais également en favorisant l'activation des LTreg (251).

Les macrophages M2b sont stimulés par les complexes immuns et les ligands des récepteurs TLR et du récepteur à l'IL-1. Ils produisent à la fois des cytokines pro- et anti-inflammatoires (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-10) et la chimiokine CCL1, mais favorisent également la stimulation des LT régulateurs et la production d'Ac (239).

Les macrophages M2c sont polarisés par l'IL-10 et les glucocorticoïdes et sont de puissants anti-inflammatoires en produisant du TGFβ et de l'IL-10 (239, 252). De par leurs fonctions immunorégulatrices, les M2c sont impliqués dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire en favorisant l'élimination des cellules infectées et apoptotiques notamment via le récepteur CD36 sans production de médiateurs inflammatoires (253). De plus, tout comme les M2b, les macrophages M2c présentent une forte expression d'arginase-1 inhibant la production intracellulaire d'oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$) à activité microbicide *via* la NOS.

Les macrophages M2d sont quant à eux stimulés pas les agonistes des TLR et produisent des médiateurs anti-inflammatoires et pro-angiogéniques comme le VEGF (Facteur de Croissance de d'Endothélium Vasculaire).

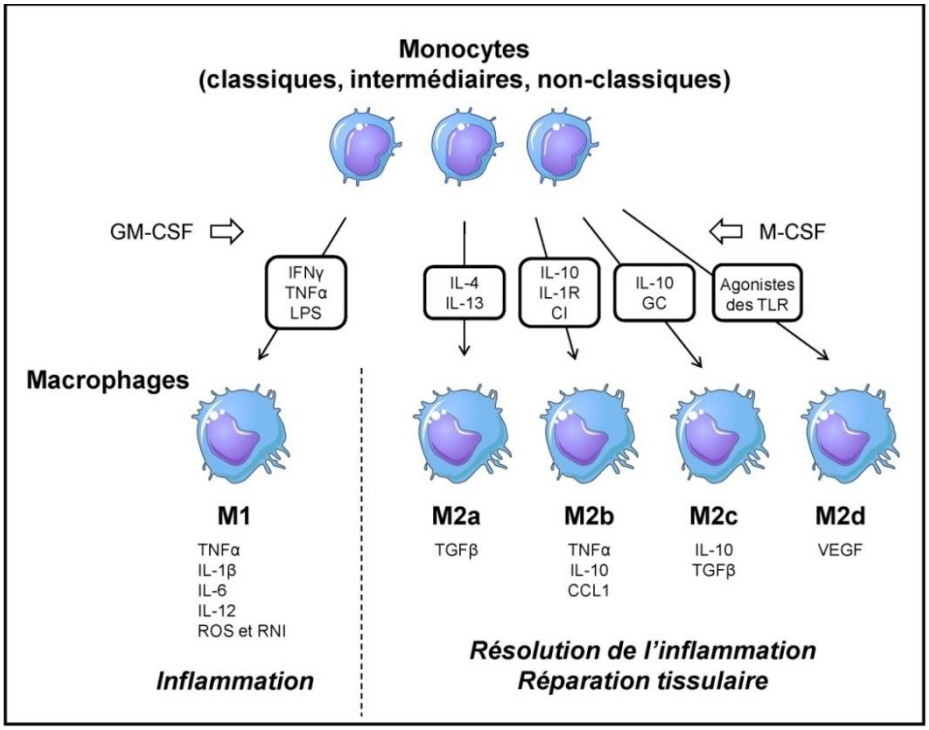


Figure 12 : La polarisation des monocytes en macrophages

II-3.3) Propriétés des monocytes/macrophages

II-3.3.1/ La phagocytose

La phagocytose est un processus essentiel permettant l'élimination de pathogènes mais également de cellules infectées, vieillissantes ou apoptotiques ainsi que de divers débris cellulaires et autres particules. Par ce biais, les monocytes/macrophages sont les garants de l'homéostasie tissulaire et contribuent au remodelage des tissus lésés, suite à une inflammation par exemple. La découverte des propriétés phagocytaires des monocytes/macrophages par Elie Metchnikoff lui a valu le prix Nobel de Médecine en 1908. Lors d'une infection palustre, les monocytes/macrophages ont ainsi la capacité de détecter et phagocyter les GRi par *P. falciparum* et les mérozoïtes libres dans le sang *via* leurs récepteurs de surface PRR. Cette reconnaissance peut se faire de façon indirecte par le biais d'opsonines, ou de façon directe. On parlera donc respectivement de phagocytose opsonique et de phagocytose non-opsonique. Qu'elle soit directe ou indirecte, les mécanismes mis en place lors de la phagocytose suivent différentes étapes :

1/ L'adhérence : les récepteurs présents à la surface du monocyte/macrophage reconnaissent directement l'antigène parasitaire, ou le parasite préalablement fixé à une opsonine.

2/ L'internalisation (phase rhéologique) : Cette liaison déclenche une cascade de phosphorylations conduisant au réarrangement du réseau d'actine et la déformation de la membrane du monocyte/macrophage. Ce dernier va développer des prolongements cytoplasmiques appelés pseudopodes, qui vont entourer et internaliser le GRi ou le mérozoïte, créant ainsi une vacuole appelée le phagosome.

3/ La destruction : le phagosome va fusionner avec des lysosomes formant alors le phago-lysosome permettant la digestion du parasite via différents mécanismes (acidification, hydrolysation, production de ROS et de RNI …)

4/ Présentation antigénique : les peptides parasitaires issus de la digestion du phago-lysosome sont présentés à la surface du monocyte/macrophage par les molécules du CMH-I et II. Les monocytes/macrophages jouent donc le rôle de CPAg, mais, contrairement aux cellules dendritiques, principales CPAg de l'organisme ayant la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, les monocytes/macrophages activent les LT déjà présents sur les sites inflammatoires.

a. La phagocytose indirecte, dite opsonique :

La phagocytose indirecte est dite opsonique car elle nécessite la présence d'une molécule intermédiaire appelée opsonine pouvant être de nature diverse : (anticorps, composants activés du complément ou la protéine C-Réactive). Les monocytes/macrophages vont alors lyser les GRi et les parasites préalablement marqués par des opsonines reconnaissant les Ag parasitaires *via* leur système ADCC. Cette phagocytose met en jeu différents types de récepteurs présents à la surface des monocytes/macrophages comme les récepteurs Fc aux immunoglobulines FcγR I, II et III (appelés CD64, CD32 et CD16) ou encore les récepteurs du complément (116, 254).

Les monocytes intermédiaires, caractérisés par une forte expression du CD16, semblent être la sous-population de monocytes la plus impliquée dans la phagocytose opsonique de *Plasmodium* (229, 230). Ainsi, le récepteur CD16 a la capacité de reconnaitre et de phagocyter les fragments constants des IgG jouant ici le rôle d'opsonines induisant donc la lyse de la cellule cible (190, 254). Par ce phénomène, les IgG participent donc à la protection palustre (171, 255). Cependant, comme cela a déjà été évoqué précédemment, la phagocytose opsonique des GRi ne semble pas dépendre uniquement de CD16 mais également de la présence de récepteurs du complément présents à la surface des monocytes intermédiaires (230). Les monocytes non-classiques n'exprimant pas ces récepteurs ne semblent donc pas avoir la capacité de phagocyter les GRi de manière opsonique malgré l'expression de CD16.

b. La phagocytose directe, dite non-opsonique :

Cette phagocytose permet une lyse du GRi ou du parasite par une reconnaissance directe entre l'antigène parasitaire et le récepteur présent à la surface du monocyte/macrophage (256). Elle ne dépend donc pas de la présence d'Ac et, en ce sens, pourrait être primordiale chez les sujets non immuns comme les enfants. De plus, contrairement à la phagocytose opsonique (190), elle n'induit pas la production de cytokines pro-inflammatoires reconnues pour être associées aux formes graves de paludisme (247, 257, 258). La phagocytose non-opsonique met en jeu différents types de récepteurs : les récepteurs lectine de type C tels que les récepteurs mannose (CD206) ou dectine, et les récepteurs scavengers également appelés « éboueurs ». Dans cette thèse je m'intéresserai plus particulièrement aux récepteurs scavengers et leur rôle dans la phagocytose directe et l'élimination des parasites.

Ces derniers sont des glycoprotéines capables de se lier à de nombreuses molécules telles que des composés anioniques, des lipoprotéines de faibles densités (LDL) et des pathogènes. Ils peuvent être séparés en 3 classes A, B et C ne partageant aucune structure commune. Mes

travaux s'intéressent principalement au récepteur de classe B CD36 déjà connu pour jouer un rôle dans la phagocytose non-opsonique des GRi par *P. falciparum* (81, 245, 247, 258–265).

Description générale du récepteur CD36 :

Le CD36 est un récepteur retrouvé de façon ubiquitaire sur un grand nombre de cellules, notamment les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales ou encore les hépatocytes (266). L'épissage alternatif du gène codant pour CD36 est tissu-dépendant expliquant ainsi la complexité fonctionnelle du récepteur et de sa régulation. Sa structure primaire est très conservée chez les mammifères. Les propriétés de CD36 sont multiples et variées. En effet, de nombreuses études ont montré son implication dans le métabolisme des lipides et dans la physiopathologie de l'athérosclérose (266). Il joue également un rôle anti-angiogénique sur les cellules endothéliales (267). Dans le cadre du paludisme, il joue un rôle double dans la phagocytose non opsonique *via* son expression par les monocytes/macrophages et dans l'adhésion des GRi à l'endothélium vasculaire *via* son expression par les cellules endothéliales (247).

Régulation de CD36 et implications de PPARγ et Nrf2 :

Plusieurs facteurs de transcription sont connus pour activer l'expression de CD36 sur les monocytes/macrophages dont PPARγ, Nrf2 et HIF-1 (hypoxia-Inducible factor-1) (245, 259, 262). PPARγ (Peroxysome Proliferator-Activated Receptor gamma) est un récepteur nucléaire activant la transcription de gènes cibles anti-inflammatoires et antioxydants en se fixant sur leurs séquences promotrices appelées PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element). Une fois activé, PPARγ est également capable d'inhiber l'activité de facteurs de transcription pro-inflammatoires, dont NFκB, STAT-6 et AP-1 (268), limitant ainsi l'expression de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNFα, IL-1β, IL-6 ou le $NO^{\cdot}$ (269). Les ligands de PPARγ sont de nature diverse. Les ligands endogènes sont souvent issus du métabolisme lipidique (acides gras polyinsaturés, éicosanoïdes, et autres composés issus de l'oxydation des LDL), principalement de l'acide arachidonique, comme par exemple la prostaglandine 15-dPGJ2 issue de l'activation de la cyclooxygénase 2 (COX-2) (270). Des ligands synthétiques ont également été mis en évidence comme les thiazolidinediones dont la rosiglitazone (271, 272), mais également les anti-inflammatoires non-stéroïdiens tels que l'ibuprofène ou l'indométacine (273).

Une voie secondaire d'activation de CD36 implique le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) (259, 262, 274–276). Ce dernier fait parti de la famille des facteurs de transcription basiques à motif leucine zipper (b-ZIP) CNC. C'est un récepteur

hétérodimérique largement retrouvé dans les tissus de l'organisme et sur les cellules immunitaires. La régulation de Nrf2 met en jeu la protéine inhibitrice Keap1 (Kelch-like associated protein 1). En condition physiologique, Keap1 séquestre Nrf2 dans le cytoplasme de la cellule en se fixant au facteur de transcription induisant sa dégradation par le protéasome (277). Lors d'un stress oxydant ou lors de la liaison de ligands activateurs sur Nrf2, le complexe Keap1/Nrf2 de détache libérant ainsi Nrf2 qui pourra alors migrer vers le noyau et se dimériser avec des petites protéines de la famille MAF. Il se fixera ensuite sur l'ADN au niveau de séquences ARE/EpRE (antioxidant response elements/electrophile response elements) régulant les mécanismes oxydatifs de l'organisme. L'éventail de gènes régulés par Nrf2 est large et divers (278). Il comprend entre autres des gènes impliqués dans le contrôle de l'équilibre redox et l'homéostasie cellulaire tels que l'*HMOX1* (gène codant pour l'hème oxygénase-1 ou HO-1), la NAD(P)H deshydrogenase quinone 1 (*NQO1*), ou encore les glutathionne S-transférases (*GST*). De plus, il a été récemment montré que Nrf2 régule directement l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'Il-1β ou l'IL-12 mais également le gène de la NO-synthase 2 (*NOS2*) (279). Les ligands activateurs de Nrf2 sont nombreux et de nature variée. On compte par exemple des molécules issues du métabolisme de l'acide arachidonique comme la prostaglandine 15-dPGJ2, de l'oxydation des LDL, mais également des ligands synthétiques comme le sulforaphane (276). La régulation négative de Nrf2 est quant à elle moins connue.

Rôle de CD36 lors de l'infection palustre :

Lors d'une infection palustre, le CD36 reconnait l'antigène parasitaire *Pf*EMP1 présent à la surface des GRi au niveau du domaine CIDR (Cystein-Rich Inter Domain). De façon intéressante, CD36 est capable de lier l'ensemble des variants de *Pf*EMP1, mais à l'inverse, une simple modification génétique du récepteur CD36 affecte directement sa liaison à l'antigène parasitaire (280). CD36 peut également se lier à une phosphatidylsérine (PS) présente à la surface du GRi (281). En effet, suite à un stress oxydant ou lors d'une infection palustre, ce phospholipide membranaire initialement retrouvé sur la face interne de la membrane plasmique sera externalisé et donc détectable par CD36 (282).

Comme décrit précédemment, les monocytes/macrophages ont la capacité de reconnaitre et phagocyter les GRi par *P. falciparum via* le récepteur CD36, démontrant le rôle bénéfique de CD36 dans l'élimination des parasites (81, 247, 257–259, 261–265). Des travaux effectués au laboratoire ont montré que l'IL-13 induisait l'expression de CD36 à la surface des monocytes *via* l'activation de PPARγ, conduisant à la phagocytose non-opsonique des GRi (245).

D’autres travaux effectués sur la souris ont ensuite révélés que dans des conditions inflammatoires, l’expression de PPARγ était réprimée, contrairement à celle de Nrf2. Ainsi, Nrf2 pouvait être activé *via* un agoniste permettant ainsi de promouvoir l’expression de CD36 et l’élimination des GRi indépendamment de PPARγ (262).

De plus, les cellules endothéliales vasculaires présentent à leur surface différentes molécules d’adhésion comme ICAM-1, VCAM, EPCR ou encore le récepteur CD36, pouvant reconnaitre et lier les GRi (283). Dans le cadre du neuropaludisme, ces derniers adhèreront à l’endothélium des micro-vaisseaux cérébraux contribuant d’une part à la survie du parasite en évitant leur phagocytose mais également à la pathogénèse de l’infection en déclenchant entre autre une obstruction du flux sanguin (284, 285). Une étude sur un modèle d’ECM sur des souris invalidées pour CD36 a montré que ce récepteur était indispensable à la séquestration des GRi jouant donc un rôle défavorable dans la pathogénèse des formes graves de paludisme, mais n’était pas indispensable à l’établissement du neuropaludisme et n’est pas associé au décès des souris (286). Dans ce sens, il a également été montré que CD36 était peu exprimé au niveau des micro-vaisseaux cérébraux remettant en cause son implication dans la pathogénèse du neuropaludisme (260). Chez l’homme, des études ont rapporté un rôle bénéfique de ce récepteur lors d’une infection palustre. En effet, chez les patients atteints de formes graves, les GRi semblent majoritairement adhérer au récepteur ICAM-1, contrairement aux patients atteints de paludisme non compliqué dont les GRi vont plutôt adhérer à CD36 (287). De plus, la surproduction de la cytokine pro-inflammatoire TNFα lors des formes sévères conduit à l’augmentation de l’expression d’ICAM-1 contrairement à CD36 dont l’expression n’est pas régulée par le TNFα à la surface des cellules endothéliales. Comme expliqué précédemment, les agonistes activateurs de PPARγ permettent d’augmenter l’expression de CD36 tout en inhibant la production de TNFα (269), et ne seraient pas ou peu impliqués dans le phénomène de séquestration (272, 288).

En conclusion, le rôle de CD36 au cours du paludisme est encore discuté. S’il est clair qu’il joue un rôle bénéfique dans l’élimination des GRi lorsqu’il est exprimé à la surface des cellules phagocytaires telles que les monocytes/macrophages, il pourrait également être associé à la sévérité palustre en participant à la séquestration des GRi dans la microcirculation lorsqu’il est exprimé par les cellules endothéliales (289).

c. Rôle de *Plasmodium* dans l'altération de la phagocytose :

Comme expliqué précédemment, la phagocytose des GRi et des mérozoïtes par les monocytes/macrophages, qu'elle soit directe ou indirecte, est essentielle à la clairance parasitaire. Cependant, *Plasmodium* aurait le pouvoir d'altérer voire d'inhiber cette phagocytose. En effet, des travaux effectués chez la souris indiquent que les parasites auraient la capacité d'induire directement l'apoptose des macrophages dans le foie des souris (290, 291). Une étude a également montré que le récepteur CD47 exprimé à la surface des GRi permettait aux parasites d'échapper à la phagocytose par les monocytes/macrophages et de diminuer leur production de cytokines pro-inflammatoires, limitant donc la mise en place des réponses inflammatoires (292). De plus, une étude a révélé que l'expression du récepteur au complément 1 (CR1, également appelé CD35) présent à la surface des monocytes, était diminuée en présence de GRi à la fois chez l'homme et chez la souris, soulignant le rôle de *Plasmodium* dans la régulation de la phagocytose indirecte par les monocytes (293). Enfin, Dobbs *et al* ont récemment montré que les monocytes de patients atteints de paludisme grave présentaient des capacités de phagocytose (opsonique et non-opsonique) réduites (186). Dans cette étude les monocytes intermédiaires et non-classiques ont été identifiés comme étant les deux sous-populations majoritaires permettant la phagocytose des GRi.

II-3.3.2/ Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

Les monocytes ont la capacité d'inhiber la croissance des parasites à l'intérieur des GRi préalablement opsonisés par des IgG, en sécrétant des médiateurs cytotoxiques (294). Ce système de défense appelé ADCC, est primordial lors d'une infection palustre et serait corrélé à une diminution de la parasitémie et une amélioration clinique chez l'homme (295). Une autre étude *in vitro* a montré que des monocytes humains incubés avec des GRi par *P. falciparum* en présence d'IgG produisent de la trappine-2. Cette molécule se localise à la surface des mérozoïtes et inhibe ainsi la croissance des parasites (296). La surexpression de trappine-2 dans un modèle expérimental de paludisme cérébral conduit à une réduction de la séquestration du parasite dans les organes profonds tels que la rate ou le cerveau, augmentant ainsi la survie des souris (296). En revanche la phagocytose d'immuno-complexes peut altérer les propriétés des monocytes. En effet, une fois ingéré, l'ADN parasitaire peut se lier aux pigments d'hémozoïne et activer l'inflammasome exacerbant donc les réactions pro-inflammatoires et la sécrétion de ROS et RNI (297). Les propriétés cytotoxiques des

monocytes via leur système ADCC met en évidence la nécessité d'une collaboration étroite entre les réponses immunitaires innée et acquise (294).

II-3.3.3/ Production de cytokines

Comme expliqué précédemment, les cytokines sont des protéines membranaires ou sécrétées par différentes cellules immunitaires comme les LT mais également les monocytes/macrophages. Elles peuvent être pro-inflammatoires (TNFα, IFNγ, IL-1β, IL-6 et IL-12) ou anti-inflammatoires (IL-10 et TGFβ), et ont la capacité de réguler les fonctions des cellules immunitaires mises en jeu lors d'une infection palustre (voir le point II-2.2.1/b, Tableaux 3a et 3b). Comme cela a déjà été mentionné, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages est augmentée de façon précoce lors d'une infection palustre chez l'homme et chez la souris contribuant au contrôle de la parasitémie et à l'élimination du pathogène. En revanche, une réponse inflammatoire excessive contribue à la pathogénicité palustre et nécessite une balance de régulation délicate, notamment possible par la production de cytokines anti-inflammatoires.

** Cytokines produites durant le stade sanguin :*

Chez l'homme comme chez la souris, des travaux ont montré que la liaison des ancres GPI de *Plasmodium* aux récepteurs TLR2 et TLR4 présents à la surface des monocytes/macrophages initie une cascade de signalisation impliquant la protéine MyD88, les facteurs de transcription NF-κB et AP-1, ainsi que le facteur régulateur de l'interféron (IRF). Ce processus induira l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IFNγ, TNFα, IL-1β, IL-6 et IL-12) et anti-inflammatoire (IL-10) (80, 298–300). D'autres études ont révélé que la proportion de monocytes ayant phagocytés des cristaux d'hémozoïne augmente au cours de l'infection et serait corrélée à la sévérité palustre (301, 302). L'hémozoïne ingérée va s'accumuler au sein des monocytes et interagir avec le TLR9 intracellulaire (299). Ce processus semble altérer les propriétés des monocytes (303, 304), en augmentant par exemple la production de cytokines pro-inflammatoires et de ROS (305). Ce mécanisme peut également jouer un rôle délétère dans l'érythropoïèse lors de paludismes sévères (306). De plus, les monocytes ont la capacité de phagocyter des vésicules extracellulaires contenant des antigènes parasitaires libérés par les GRi. Ces dernières vont alors pouvoir modifier les propriétés des monocytes en stimulant notamment les réponses pro-inflammatoires et la production de TNFα (80, 307–310).

Les concentrations plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFNγ, le TNFα, l'IL1-β, ou l'IL-12 ont souvent été décrites comme étant augmentées lors d'infections palustres à *P. falciparum*. Comme décrit précédemment, l'IFNγ et l'IL-12 sont des cytokines clés de la réponse immunitaire précoce face au *Plasmodium*, produites entre autres par les lymphocytes (IFNγ) et les monocytes/macrophages (IL-12), et permettent notamment l'activation de cellules de immunité innée comme les neutrophiles et les cellules NK (138, 143). L'IFNγ semble également promouvoir la détection ainsi que la phagocytose opsonique des parasites de *Plasmodium* en favorisant l'expression des molécules du CMH-II et des Fc récepteurs à la surface des monocytes/macrophages (311). Le TNFα est une autre cytokine pro-inflammatoire essentielle lors d'une infection palustre. Sa sécrétion par les monocytes/macrophages est entre autre stimulée par la libération de facteurs parasitaires lors de l'éclatement des GRi et permet l'activation de cellules immunitaires comme les neutrophiles (298). Le TNFα contribue également à la surexpression des récepteurs Fc à la surface des monocytes/macrophages, tels que le CD16, favorisant ainsi la phagocytose opsonique des GRi et donc l'élimination des parasites (312). De plus, une étude a montré que l'inhibition du TNFα chez les souris infectées par *P. chabaudi* conduisait au développement d'un paludisme létal (313). Le TNFα reste néanmoins la cytokine la plus souvent associée à la sévérité palustre (153, 155, 156, 159) et au neuropaludisme (154, 314). De plus, des travaux antérieurs effectués au laboratoire ont montré que le TNFα avait la capacité de diminuer l'expression du CD36 à la surface des monocytes/macrophages humains réduisant donc la phagocytose et l'élimination des GRi dépendantes de CD36 (244, 315).

Les cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGFβ, produites à la fois par les macrophages et les LT, sont primordiales dans la régulation des réponses pro-inflammatoires. Des études ont notamment montré que *P. falciparum*, *via* son antigène parasitaire *Pf*EMP1 présent à la surface des GRi, peut activer directement la production de TGFβ et inhiber la production d'IFNγ par les cellules NK, ce qui suggère que le parasite a la capacité de moduler directement la réponse immunitaire innée et de limiter les réponses pro-inflammatoires essentielles à son élimination (316, 317). Une étude récente a montré que l'antigène *Pf*EMP1 peut moduler la production de cytokines par les monocytes/macrophages. Ces derniers produiront moins de TNFα, IL-1β, IL-6, CCL2, CCL3, CCL4 et IL-10 (318). Dans le même sens, des études *in vitro* ont révélé que l'interaction entre les GRi par *P. falciparum* et le récepteur CD36, présent entre autres à la surface des monocytes/macrophages et des cellules dendritiques, pourrait conduire à la perturbation des fonctions des cellules immunitaires pour favoriser un état d'immunotolérance. Ces dernières produisent alors plus d'IL-10 que d'Il-12,

réduisant leur capacité à activer les LT, conduisant au retard de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (319, 320). De plus, des études ont montré que les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGFβ, mais également la prostaglandine E2, peuvent diminuer l'expression de CD36 à la surface des monocytes/macrophages (321, 322). Enfin, les productions de TGFβ (314) et d'IL-10 ont été associées au développement d'un neuropaludisme (314, 323, 324).

** Cytokines et neuroinflammation :*

Les fonctions physiologiques des cellules endothéliales sont nombreuses et variées. Outre leur propriété essentielle dans le contrôle de la perméabilité endothéliale, elles possèdent des propriétés anticoagulantes empêchant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes et des leucocytes notamment par la libération de $NO^{\cdot}$, l'inhibition de l'expression de molécules d'adhésion (comme ICAM-1, VCAM-1, EPCR) et de la sécrétion de chimiokines. Ces dernières sont de petites cytokines capables d'activer et recruter des cellules immunitaires sur les sites inflammatoires (325). Différentes familles de chimiokines ont été décrites en fonction de leurs caractéristiques structurales : CXC, CC, C, CX3C. Les monocytes/macrophages ont la capacité de moduler le type et la quantité de chimiokines qu'ils produisent en fonction de leur microenvironnement. Une réponse Th1 sera souvent associée à la production de chimiokines comme CCL2, CCL3 et CCL5, CXCL8, CXCL9 et CXCL10 et à l'expression de récepteurs comme CCR5, CCR7 et CXCR3. Une réponse régulatrice correspondra quant à elle, à l'expression de récepteurs comme CCR3, CCR4 et CCR8 (Tableau 3b).

Lors d'une neuroinflammation comme cela est le cas au cours d'un paludisme cérébral, les GRi et les cellules immunitaires vont s'accumuler dans les micro-vaisseaux cérébraux conduisant à l'activation des cellules endothéliales. Cette séquestration, ainsi que la production de cytokines et particulièrement de chimiokines à la fois par l'endothélium activé et par les cellules immunitaires créent un cycle inflammatoire local. Des études ont montré que l'augmentation des concentrations plasmatiques des trois cytokines pro-inflammatoires TNFα, IL-1β et IFNγ, décrites comme jouant un rôle dans l'activation de l'endothélium vasculaire, (326) seraient associées au développement du neuropaludisme (314, 324). Comme énoncé précédemment, la liaison des ancres GPI de *Plasmodium* aux récepteurs TLR2 et TLR4 des monocytes induit la production de cytokines pro-inflammatoires (IFNγ, TNFα, IL-1β, IL-6 et IL-12) (80, 298, 300), mais également la sécrétion d'oxyde nitrique $NO^{\cdot}$. Cet environnement inflammatoire et pro-oxydant, conduit indirectement à la surexpression de

molécules d'adhésion comme ICAM-1 à la surface de l'endothélium vasculaire, jouant un rôle délétère dans les formes graves de paludisme (300).

De nombreux travaux mettent en évidence le rôle majeur des chimiokines dans la physiopathologie du paludisme cérébral. En effet, la production de chimiokines pro-inflammatoires à la fois par l'endothélium vasculaire et par les cellules immunitaires pérennise la neuroinflammation contribuant à la pathogénèse (Tableau 3b). Des études ont par exemple révélé que les concentrations plasmatiques de CCL2, CCL3, CXCL8 et CXCL10 étaient associées au neuropaludisme chez l'homme (324, 327, 328). Chez la souris, le rôle délétère des chimiokines CXCL9 et CXCL10 lors d'un paludisme cérébral a également été mis en évidence (329). De plus des travaux ont montré que l'expression génique des chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9 et CXCL10 était augmentée dans les cerveaux des souris présentant un paludisme cérébral (330, 331). Néanmoins, il est difficile de déterminer dans les cerveaux des souris quels types de cellules produisent chaque cytokines et dans quelles proportions. Des études sont donc encore nécessaires afin de mieux comprendre l'implication des monocytes/macrophages et des autres cellules immunitaires dans la production de cytokines au niveau de la microcirculation cérébrale lors d'un neuropaludisme. De plus, certaines cytokines ont été identifiées comme jouant un rôle dans l'altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, CCL2 semble capable d'augmenter la perméabilité de la BHE en diminuant notamment l'expression de la Caveoline-1, protéine membranaire impliquée dans les phénomènes d'endocytose, à la surface des cellules endothéliales (332). Les vésicules extracellulaires libérées par les GRi peuvent également se lier et activer les cellules endothéliales, et tout comme CCL2, diminuer l'expression de la Caveoline-1 conduisant à l'altération de l'intégrité de la BHE (333). Les chimiokines CXCL9 et CXCL10 permettent quant à elles le recrutement des LT CD8 cytotoxiques au niveau du cerveau, conduisant à la libération de granzymes induisant l'apoptose des cellules endothéliales composant la BHE (124–127, 334). La microglie (macrophages résidents du cerveau) est également activée lors d'un neuropaludisme et participera à la production de cytokines (telles que CCL2, CXCL9 ou CXCL10) et l'exacerbation de la neuroinflammation chez l'homme comme chez la souris (335, 336).

II-3.3.4/ Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de dérivés nitrés (RNI)

L'équilibre redox est un problème majeur mais mal compris dans la physiopathologie du neuropaludisme. Comme cela a été énoncé précédemment, l'inflammation observée lors d'un neuropaludisme est associée à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de dérivés nitrés (RNI) à la fois par les parasites lors de la digestion de l'hémoglobine mais également par les différentes cellules immunitaires y compris les monocytes/macrophages (4, 337). Ces substances participent à la destruction des GRi et à l'élimination des parasites, mais sont aussi connues pour stimuler ou inhiber les réponses inflammatoires et la production de cytokines (338).

Lors de la phagocytose des GRi, les ROS sont produits au niveau membranaire par la NADPH oxydase appelée NOX2 dont l'activation est favorisée par la présence d'IFNγ (4). Cette enzyme catalyse l'oxydation de la NADPH par l'oxygène (O_2) produisant alors du $NADP^+$, du H^+ et de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$). La superoxyde dismutase (SOD) catalysera ensuite la réaction entre H^+ et $O_2^{\cdot -}$ aboutissant à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui réagira avec de l'H^+ et du Cl^- sous l'action de la myéloperoxydase pour finalement donner de l'acide hypochloreux (HOCl) et de l'eau ou se transformer en radical hydroxyle ($HO^{\cdot}$) par l'action du Fer. L'H_2O_2 subira ensuite des cycles d'oxydoréduction régulés par les enzymes GPx (glutathione peroxydase), GR (glutathione réductase) et TrxR (Thioredoxine reductase) (Figure 13).

De même, les cellules endothéliales, les neurones ou encore les monocytes activés par l'IFNγ et les macrophages M1, ont la capacité de produire de l'oxyde nitrique également appelé monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$) via la NO-synthase (NOS) (3, 339). Cette dernière catalyse la réaction entre la L-arginine et l'oxygène produisant alors du $NO^{\cdot}$ qui donnera par la suite du peroxynitrite ($ONOO^-$) en présence de fortes concentrations d'$O_2^{\cdot}$ (Figure 13).

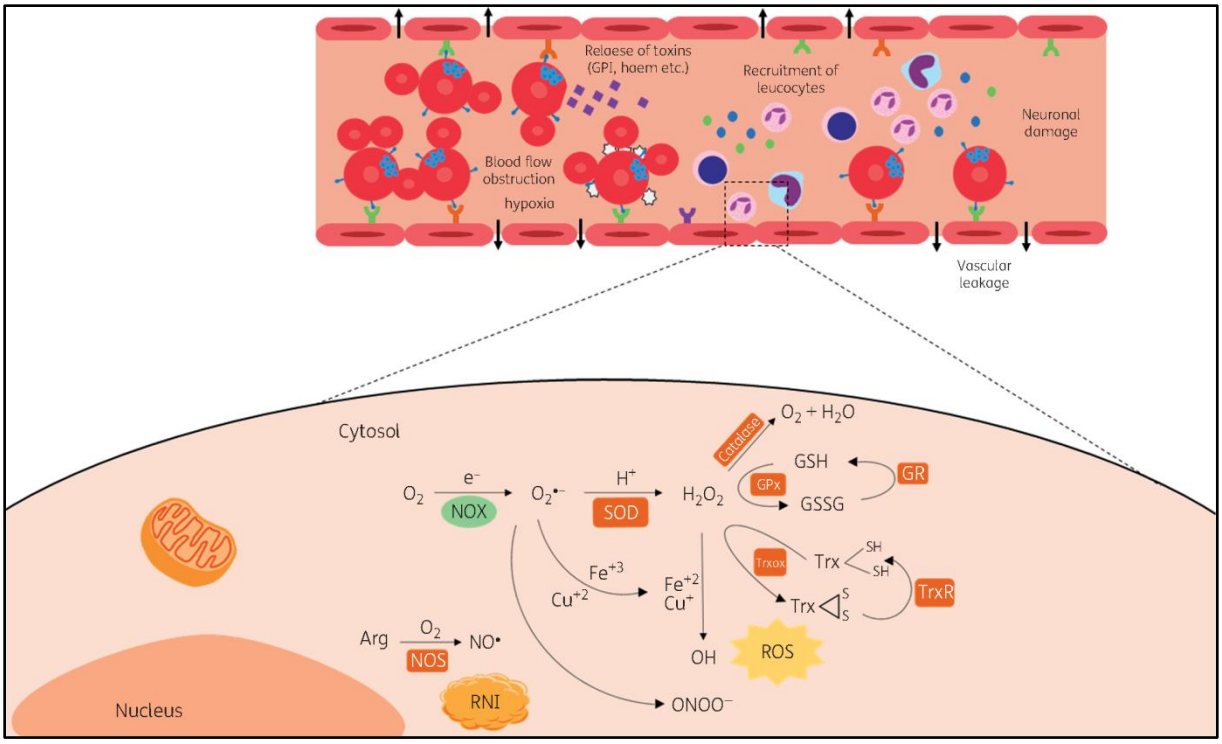


Figure 13 : Mécanismes généraux conduisant à la production de ROS et de RNI au cours d'une infection palustre (source : Pereira *et al*, 2020 (4))

Durant un neuropaludisme, ces ROS et RNI sont habituellement produits par le macrophage et retrouvés en fortes quantités dans le phagolysosome. Ils participent donc à la protection palustre en favorisant la destruction des parasites ingérés (4, 244, 340). Dans ce sens, l'administration d'un régime pro-oxydant à des souris limite la neuroinflammation et favorise l'élimination des GRi lors d'un ECM (341). Tout comme les ROS, les RNI et principalement le $NO^{\cdot}$ produit au cours d'une infection palustre, peuvent jouer un rôle protecteur dans la physiopathologie de l'infection. Le $NO^{\cdot}$ possède de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Il est principalement connu pour ses propriétés vasodilatatrices mais c'est aussi un puissant neurotransmetteur ayant également la capacité de réguler l'apoptose des cellules et notamment des monocytes/macrophages en produisant d'autres types de ROS et RNI. Si certains travaux suggèrent un rôle délétère du $NO^{\cdot}$ dans la physiopathologie du neuropaludisme *via* ses effets immunosuppresseurs (342–345), d'autres études ont montré qu'il n'est pas nécessaire au développement du neuropaludisme (346). En effet, la production de $NO^{\cdot}$ semble même être inversement corrélée à la gravité palustre (347–352). Ces travaux mettent en évidence les capacités du $NO^{\cdot}$ à réduire la cytoadhérence des GRi aux cellules endothéliales, à induire une vasodilatation, à diminuer l'agrégation plaquettaire, ou encore à jouer un rôle dans les mécanismes d'apoptose cellulaire. Par ailleurs, Weinberg *et al* on

montré que les faibles taux de $NO^{\cdot}$ détectés chez les patients atteints de neuropaludisme pourraient être dus à la polarisation M2 des macrophages conduisant à la production d'urée et d'ornithine plutôt que de $NO^{\cdot}$ (352). Ainsi, en produisant peu de $NO^{\cdot}$, les macrophages M2 semblent jouer un rôle délétère dans la pathologie palustre (337). Il a donc été suggéré qu'un traitement permettant de reverser la polarisation des monocytes M2 vers un phénotype M1 pourrait contribuer à la protection palustre (352). De plus, le $NO^{\cdot}$ produit par l'endothélium vasculaire régule l'expression de l'angiotensine-2, marqueur de la perméabilité vasculaire responsable de l'augmentation de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (353–355). Ainsi, dans un modèle d'ECM, des études ont révélé que l'administration de L-arginine a permis d'augmenter les taux de $NO^{\cdot}$ conduisant à une meilleure survie des souris (356). D'autres travaux ont démontré que l'administration d'hème, molécule hautement pro-oxydante, permettait de protéger des souris atteintes de neuropaludisme (357).
De nombreux médicaments antipaludéens actuellement utilisés ont des mécanismes d'action pro-oxydants impliquant la formation de ROS permettant d'éliminer les parasites. Par exemple, la chloroquine va se fixer à la ferriprotoporphyrine IX (FP) inhibant ainsi la polymérisation de l'hème en cristaux d'hémozoïne. La FP va donc s'accumuler dans la vacuole digestive conduisant à la production de ROS, à une peroxydation lipidique au niveau de la membrane et à la destruction du parasite (4, 358). De même, les mécanismes d'action des dérivés de l'artémisinine impliquent également la production de ROS et l'accumulation de FP toxiques (359).

La production de ROS et RNI peut cependant avoir des effets délétères sur les cellules endothéliales des micro-vaisseaux cérébraux et participer à l'altération de la BHE (4, 358, 360, 361). En effet, les processus pro-oxydants conduisent à un déséquilibre entre les oxydants plasmatiques et le système antioxydant de l'hôte, entrainant alors un stress oxydatif. Chez l'homme, les ROS produits au cours d'un neuropaludisme vont induire une peroxydation lipidique dont les marqueurs sont détectables dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients conduisant à une augmentation de la perméabilité vasculaire et aux dommages cérébraux observés. (362). De plus, une étude *in vitro* a démontré le rôle de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et du peroxynitrite ($ONOO^-$) dans l'altération de l'intégrité de la BHE (344). Les autopsies de cerveaux de patients décédés d'un neuropaludisme ont révélé que les monocytes et macrophages exprimaient fortement HO-1, marqueur témoin du stress oxydant (363). Ce résultat à été confirmé chez la souris et la surexpression de HO-1 a été corrélée à une diminution de l'expression génique de la superoxyde dismutase (SOD), marqueur clé de

la réponse antioxydante (364). Dans l'organisme, le glutathion existe sous deux formes, le glutathion oxydé GSSG (pro-oxydant), et le glutathion réduit GSH (antioxydant). Le ratio GSH/GSSG est un indicateur essentiel dans la mesure du stress oxydant et son taux est directement corrélé au niveau de ROS produits par les cellules. Comme cela a été mentionné, le système du glutathion est en parti responsable de la dégradation des ROS faisant de lui un acteur majeur de la réponse antioxydante. Lors d'une infection palustre, l'augmentation du stress oxydant altère le système du glutathion favorisant la synthèse de GSSG en dépit du GSH (365, 366). Ainsi, des stratégies thérapeutiques visant à amplifier les réponses antioxydantes en vue de lutter contre le stress oxydant ont permis d'améliorer la survie des souris et de limiter l'altération de la BHE dans un modèle d'ECM (344, 367–369).

Nrf2 est un facteur de transcription clé des réponses antioxydantes de l'organisme (370). Ce facteur de transcription régule des gènes impliqués à la fois dans l'équilibre redox et l'homéostasie cellulaire (*HMOX1*, *NQO1*, *GST*) (278), mais également des gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, Il-1β, IL-12), ou encore le gène de la NOS2 (279). Ainsi, Nrf2 semble donc jouer un rôle majeur dans le contrôle du stress oxydant et de la neuroinflammation (371–373). Par exemple, en induisant l'expression de NQO1, Nrf2 bloque l'activité de l'inflammasome NLRP3 inhibant ainsi la production de ROS (374). Dans le même sens, des études ont montré que Nrf2 inhibait l'expression de marqueurs activateurs et pro-inflammatoires à la surface des cellules endothéliales (375) et pourrait réduire l'altération de la BHE observée lors d'une neuroinflammation (376).

Dans le cadre d'une infection palustre, Nrf2 aurait un rôle protecteur lors d'un ECM en induisant l'expression de HO-1, enzyme connue pour cataboliser l'hème libre en ion ferreux, monoxyde de carbone (CO) et biliverdine (377). En effet, la protection palustre induite par le $NO^{\cdot}$ semble dépendre du facteur de transcription Nrf2 régulant l'expression d'HO-1 qui produira du CO. Ainsi, la production de $NO^{\cdot}$ et de CO contribue à la résolution de la neuroinflammation en inhibant l'activation des LT CD4 et CD8 cytotoxiques (377). Des travaux effectués dans notre laboratoire se sont intéressés aux niveaux d'expression de *Nrf2*, *CD36* et *HMOX1* des monocytes de femmes enceintes infectées par *P. falciparum*. Les résultats montrent que la surexpression de *Nrf2* et *HMOX1* est corrélée à une augmentation du poids du bébé à la naissance et à une plus faible parasitémie (259). A l'inverse, une autre étude a montré que de nombreux gènes régulés par Nrf2 (mais pas *Nrf2* lui-même) étaient augmentés chez les patients atteints d'anémie sévère palustre (SMA) par rapport à ceux atteints de neuropaludisme (CM) et aux enfants sains (122). Le gène codant pour HO-1 et les niveaux plasmatiques d'HO-1 étaient également surexprimés chez les enfants SMA et CM.

De plus, il a été montré que Nrf2 inhibait directement l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'Il-1β ou l'IL-12 mais également le gène de la NOS2, suggérant son rôle dans l'inhibition de la production de $NO^{\cdot}$ (279). Très récemment, Mita-Mendoza *et al*, ont montré *in vitro* que le diméthyle fumarate (DMF), un agoniste activateur de Nrf2, réduisait l'expression de marqueurs tels que VCAM, ICAM-1, IL-6 ou IL-18, sur les cellules endothéliales activées en présence de *P. falciparum* (378). Enfin, une étude menée dans un contexte non infectieux a mis en évidence qu'un stress oxydatif majeur conduisait à la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 et à la résolution de la neuroinflammation contrairement à ce qui a été reporté précédemment (379). La récupération fonctionnelle du cerveau pourrait ainsi s'appuyer sur la polarisation M2 de la microglie et des macrophages infiltrés pour réduire la neuroinflammation et le stress oxydatif (361, 380).
Le rôle de la réponse oxydante et de Nrf2 au cours du paludisme apparait donc très contrasté, des études rapportant des effets inverses, à la fois protecteurs et délétères pour le patient. Des études sont encore nécessaires pour éclaircir ces mécanismes et leurs conséquences en fonction de l'avancement de l'infection et de sa gravité.

II-3.4) Tolérance et mémoire immunitaire des monocytes

Les monocytes précédemment activés par un pathogène peuvent développer lors d'une seconde stimulation une réponse immunosuppressive appelée « tolérance immunitaire ». A l'inverse, les monocytes auraient également la capacité de conserver leur état d'activation et de maturation leur conférant des propriétés phénotypiques et fonctionnelles modifiées, et leur permettant de réagir plus efficacement en cas de seconde stimulation. Il s'agit de la mémoire immunitaire innée, également observée chez les cellules dendritiques et les cellules NK (381). Ce concept a été décrit suite à l'administration du vaccin BCG chez la souris (382). Les monocytes issus de la moelle osseuse de souris vaccinées étaient davantage bactéricides et produisaient différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, TNFα) conduisant à une meilleure élimination du pathogène *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose. Les mêmes observations ont également été faites chez l'homme (383, 384). La nature et les concentrations des pathogènes jouent un rôle dans l'activation de la tolérance ou de la mémoire immunitaire des monocytes/macrophages. En effet, de faibles doses semblent orienter vers une tolérance immunitaire quand de fortes doses tendent vers le développement d'une mémoire immunitaire (385).

Lors d'une infection palustre non compliquée, des études ont révélées que les monocytes présentaient des phénotypes et propriétés modifiés (186, 195, 299, 386). Ces changements passent par des modifications métaboliques, transcriptionnelles, ou épigénétiques. Les monocytes produisent ainsi de fortes concentrations de cytokines pro-inflammatoires en début d'infection (TNFα, IL-6, IL-12) pouvant donc contribuer à une meilleure réponse immunitaire lors d'une nouvelle infection (186). De plus, la stimulation chronique des monocytes/macrophages par un pathogène pourrait conduire au développement de cette mémoire immunitaire (387). En effet, au cours d'une infection palustre l'hémozoïne parasitaire ingérée par les monocytes/macrophages semble persister dans l'organisme plusieurs jours après l'infection (388). Des autopsies de patients décédés de neuropaludisme ont révélé que de fortes concentrations d'hémozoïne avaient été observées dans la moelle osseuse, la rate, et le cerveau des enfants (389, 390). De même, dans un modèle murin de paludisme sévère, une étude a montré que l'hémozoïne avait été retrouvée dans la rate, la moelle osseuse et le foie des souris infectées jusqu'à 196 jours après la fin du traitement (391). Il a été montré que l'absorption et l'accumulation d'hémozoïne dans les monocytes/macrophages, mais aussi dans les cellules dendritiques était impliquée dans l'inhibition de leur fonction (88, 392).

L'impact que cette mémoire immunitaire peut avoir sur les différentes sous-populations de monocytes reste encore indéterminé. Néanmoins, cette caractéristique, pourrait expliquer les différentes réponses immunitaires observées entre des sujets naïfs et ceux précédemment exposés au parasite, mais également les cas de patients asymptomatiques plus résistants vis-à-vis de l'infection. Enfin, les travaux cités précédemment concernant les modifications phénotypiques et fonctionnelles des monocytes en réponse au parasite étaient menés sur des sujets atteints de paludisme simple, il serait intéressant d'étudier ce phénomène lors de paludisme graves mais également de prendre en compte différents facteurs de l'hôte (âge, sexe, antécédents médicaux, génétique, vaccination, coinfections), du parasite (en fonction des différentes espèces de *Plasmodium*), et de l'environnement (climat, intensité de la transmission, …).

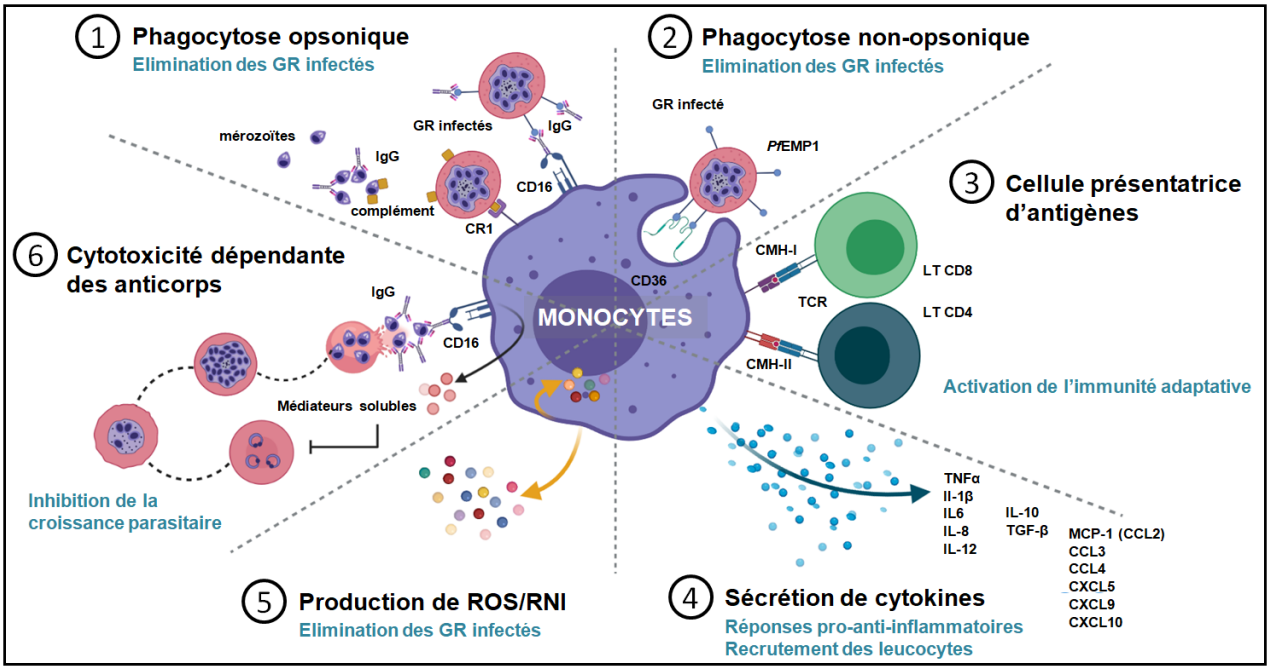


Figure 14 : Principales fonctions des monocytes/macrophages au cours d'une infection palustre

II-4. Synthèse des mécanismes physiopathologiques conduisant au développement du neuropaludisme

La cinétique des mécanismes physiopathologiques conduisant au développement de la neuroinflammation et du paludisme cérébral est encore mal connue. Ce paragraphe synthétisera les principaux évènements dont nous avons discuté dans les paragraphes précédents en mettant en évidence de rôle majeur des monocytes/macrophages à l'interface entre les réponses immunitaires innée et acquise (Figure 15). Lors d'un neuropaludisme, les GRi sont séquestrés dans les vaisseaux sanguins cérébraux (393) et cytoadhèrent à l'endothélium cérébral via des ligands parasitaires (*Pf*EMP1 en particulier) et récepteurs endothéliaux (CD36, ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, E-selectine, …) (394). L'interaction GRi/endothélium ainsi que la production de toxines et ligands inflammatoires via les GRi conduit à l'activation des cellules endothéliales (395). Ces dernières vont alors sécréter des cytokines et chimiokines conduisant au recrutement de plaquettes et cellules immunitaires (monocytes/macrophages, lymphocytes, …) au niveau du cerveau (396). Un processus inflammatoire local se met alors en place (397), accompagné d'un mécanisme de rétrocontrôle positif qui conduit à une production croissante de facteurs pro-inflammatoires (398) et un recrutement accru de cellules de l'immunité amplifiant le phénomène de séquestration. Les

cellules immunitaires vont à leur tour produire des ROS et RNI créant alors un stress oxydant favorisant l'élimination des GRi mais produisant parallèlement des dommages cérébraux (4). De plus, les astrocytes et les cellules microgliales situées dans le cerveau vont produire, sous l'effet de cytokines et des ROS, d'autres cytokines et chimiokines amplifiant encore le processus de neuroinflammation (399). Le processus inflammatoire accompagné d'un environnement oxydant participe à l'élimination d'une partie des GRi *via* leur phagocytose par les monocytes/macrophages et par la sécrétion directe de toxines et de ROS/RNI. Ainsi, le microenvironnement cérébral sera chargé de particules et Ag parasitaires pouvant être endocytés par les cellules endothéliales agissant comme CPAg pour les LT. Il a été démontré que les LT CD8 cytotoxiques jouent un rôle délétère lors d'un neuropaludisme en induisant l'apoptose des cellules endothéliales activées (124, 125). Pour éliminer ces cellules identifiées comme du non-soi, les LT CD8 vont sécréter des perforines et des granzymes qui vont lyser les membranes des cellules endothéliales constituant la BHE. L'ensemble de ce processus conduira donc à une obstruction du flux sanguin cérébral, à une augmentation de la pression intracrânienne, à une hypoxie et à une altération de l'intégrité de la BHE (Figure 15).

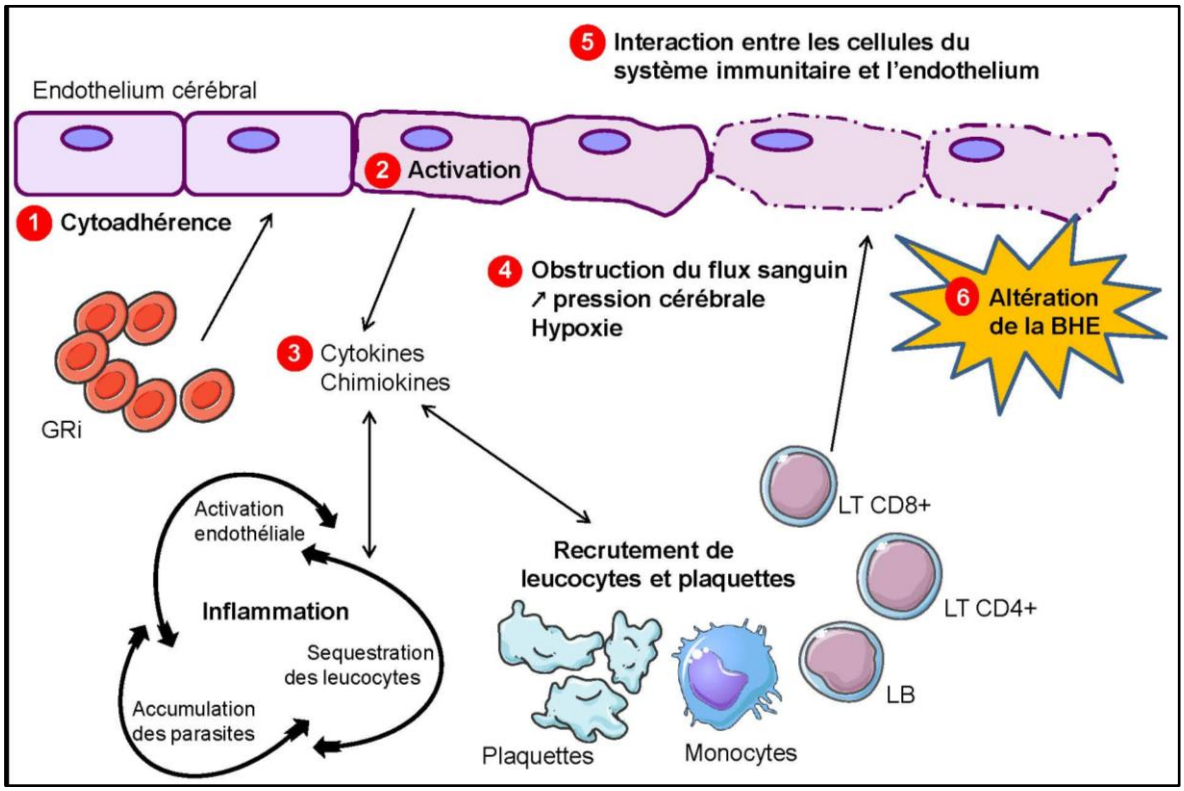


Figure 15 : Principaux mécanismes physiopathologiques conduisant au développement du neuropaludisme

II-5. Stratégies immunothérapeutiques impliquant les monocytes/macrophages

Le traitement du paludisme repose sur 2 aspects : l'élimination du parasite et la résolution de l'inflammation cérébrale. Un traitement adjuvant peut être donné en complément du traitement de première intention antiparasitaire pour augmenter l'efficacité thérapeutique de ce dernier ou diminuer les complications associées à la pathologie palustre. Jusqu'à aujourd'hui, de nombreux traitements adjuvants ont été testés sans que ces approches ne soient validées et utilisées en routine (400). Un traitement adjuvant efficace doit être sûr et doit présenter un bénéfice clair pour le patient, notamment à un stade avancé de l'infection palustre. Si de nombreuses approches se révèlent efficaces sur des modèles animaux, la plupart des molécules testées sont très discutées lors de leur application à l'homme. Le chapitre suivant dresse une liste non exhaustive des principaux traitements adjuvants testés sur le patient atteint de forme grave de paludisme et notamment le neuropaludisme, en se concentrant sur les thérapies immunomodulatrices.

II-5.1) Les immunomodulateurs

** Les corticostéroïdes :*

La dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Si une étude a montré qu'elle permettait de diminuer les niveaux de cytokines produites justifiant son rôle protecteur lors d'un paludisme (401), d'autres travaux ont révélé que son utilisation au cours d'un neuropaludisme chez l'homme ne permettait pas la diminution de la mortalité mais augmentait les risques de complications digestives ou respiratoires (402–404).

** Les immunoglobulines intraveineuses (IV) :*

La réduction de l'inflammation systémique grâce à l'administration chez l'homme d'Immunoglobulines IV n'a pas permis de diminuer la mortalité, et des séquelles neurologiques ont notamment été décrites dans certaines études (405).

** Le sulfate de curdlane :*

Le sulfate de curdlane est un polysaccharide possédant des propriétés immunomodulatrices et anticoagulantes. Il est également connu pour inhiber la croissance de *P. falciparum in vitro*. Son utilisation en tant qu'adjuvant thérapeutique au cours d'un paludisme grave n'a pas

permis une amélioration de la survie des patients ni de la clairance parasitaire mais semble réduire la gravité palustre (406, 407).

** Le charbon actif :*

La prise orale de charbon actif chez des souris atteintes d'un paludisme létal contribue à diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires et à améliorer la survie des souris. Chez des adultes volontaires sains, ce traitement s'est montré sûr, bien toléré et n'a pas interféré avec la prise d'artésunate (408). D'autres études sont actuellement en cours afin d'évaluer l'intérêt de ce traitement lors d'un paludisme simple chez l'homme.

** Les agonistes de PPARγ :*

La rosiglitazone a été initialement décrite comme un antidiabétique oral, agoniste du récepteur PPARγ impliqué dans la polarisation M2 des macrophages et la résolution de l'inflammation. Ce récepteur joue un rôle majeur dans le contrôle de la réponse immunitaire en diminuant l'inflammation générée au cours de la pathologie, en contribuant à la phagocytose et l'élimination des GRi mais également en favorisant les mécanismes neuroprotecteurs et antioxydants chez la souris (245, 272, 288, 409–412). Une étude clinique effectuée chez des jeunes adultes atteints d'un paludisme simple a évalué la tolérance, la sécurité et l'efficacité de la rosiglitazone qui s'est avérée être un médicament sûr et bien toléré par les patients (271). De plus, il a permis à la fois de limiter la production de cytokines pro-inflammatoires et de diminuer le temps de clairance parasitaire. Enfin, il a été observé à la suite du traitement de faibles niveaux d'expression de marqueurs d'activation endothéliaux et de fortes concentrations de BDNF, facteur considéré comme protecteur lors d'une neuroinflammation (271). Une autre étude menée sur des enfants atteints de paludisme simple a révélé que les patients ayant reçu de la rosiglitazone n'ont pas développé d'hypoglycémie ni d'autre complication clinique et biologique (413). Une nouvelle étude clinique (NCT02694874) est actuellement en cours afin d'évaluer l'efficacité de cette molécule sur des patients atteints de paludisme grave (414). L'ensemble de ces informations en font actuellement la molécule la plus prometteuse.

** Stratégies visant à réguler les cytokines pro-inflammatoires :*

Comme cela a été décrit précédemment, les cytokines pro-inflammatoires participent au développement du neuropaludisme. Des stratégies bloquant certaines d'entre elles ont été étudiées. Néanmoins, la complexité des mécanismes d'induction et de régulation de ces médiateurs ainsi que leur rôle à la fois bénéfique et délétère au cours de la pathologie palustre rendent extrêmement difficile la mise au point de thérapies efficaces. Ainsi, l'utilisation

d'anticorps monoclonaux anti-TNFα chez l'homme ne permet pas d'améliorer la survie des patients atteints de neuropaludisme et aggraverait même les complications neurologiques (415). La pentoxifylline, connue pour diminuer la production de TNFα, a montré des résultats divergents. Si certaines études mettent en évidence le rôle protecteur de ce médicament (416, 417), d'autres en revanche ne lui accordent aucun bénéfice, voire même une tendance à une surmortalité des patients (418–420). De même, l'utilisation dans un modèle d'ECM, d'un Ac bloquant CXCL10, chimiokine souvent associée au développement du neuropaludisme (328, 329), conduit à une augmentation de la mortalité des souris traitées (421). En revanche, l'utilisation d'atorvastatine, molécule connue pour inhiber l'expression de CXCL10, conduit à augmenter le taux de survie des souris dans un modèle d'ECM (422).

Les thérapies immunomodulatrices visant à réguler les réponses cytokiniques globales présentent en général moins d'effets néfastes que celles visant à inhiber des cytokines isolées (423). De nombreuses formulations de vaccins utilisent comme adjuvant de l'hydroxyde d'aluminium. Cependant, ce dernier semble incapable d'induire l'activation des LT (424). A l'opposé, des motifs CpG non méthylés dérivés de bactéries et reconnus par le TLR9, étaient bénéfiques dans plusieurs stratégies vaccinales. Ces derniers favorisent l'induction d'une réponse LTh1 avec la production d'IFNγ et d'IL-12 (425). De plus, une stratégie vaccinale incluant une IL-12 recombinante absorbée et de l'hydroxyde d'aluminium a conduit à la mise en place d'une réponse LTh1 et donc à l'efficacité du vaccin dépendante des LT CD4+ et des LB (421).

Le C1INH (inhibiteur de la C1 estérase), est un inhibiteur de sérine protéase régulant la perméabilité vasculaire et les réponses inflammatoires et possédant des propriétés anticoagulantes (426). Une étude a montré que les C1INH sont capables de se fixer aux ancres GPI des mérozoïtes libres et ainsi bloquer leur invasion dans les GR (427). De plus, les C1INH semblent pouvoir se fixer directement au récepteur CD36 mais également diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-1β et IL-6) par les monocytes/macrophages. Dans un modèle d'ECM, l'utilisation de C1INH a permis de diminuer la parasitémie des souris infectées et d'augmenter leur taux de survie, suggérant un rôle protecteur du C1INH dans les formes sévères de paludisme. Des études sont néanmoins nécessaires afin de déterminer son efficacité en tant que traitement adjuvant.

** Stratégie visant les sous-populations monocytaires :*

Une étude récente effectuée sur un modèle murin d'ECM a montré que les monocytes LY6C^{hi} de la circulation périphérique ayant phagocytés des microparticules immunomodulatrices

(IMP) chargées négativement, étaient séquestrés dans la rate des souris, empêchant ainsi leur migration et leur accumulation dans le cerveau (212). Le traitement par des IMP dès J3 post-infection permettait d'obtenir un taux de survie d'environ 50% chez les souris traitées sans réduction de la parasitémie. Une dose de quinine a donc été donnée tardivement aux souris ayant survécu pour éliminer le parasite et lutter contre l'anémie. De plus, une combinaison thérapeutique incluant l'administration d'artésunate et d'IMP lors de l'apparition des symptômes neurologiques a conduit à un taux de survie de 88% chez les souris, quand la survie de l'artésunate seul était de 56% et celle des IMP de 10%. Le même constat a été observé quand l'artésunate a été remplacée par la chloroquine malgré un taux de survie un peu plus bas. De plus, l'utilisation d'IMP semble diminuer la présence de microvésicules dans la circulation sanguine souvent associées à la gravité palustre. Ce traitement permet également de limiter l'accumulation des trois sous-populations de monocytes et principalement des $Ly6C^{low}$ dans le cerveau des souris. Enfin, la réinfection de souris préalablement infectées et traitées par les IMP et de l'artésunate a conduit à la survie de l'ensemble des souris, présentant de faibles parasitémies.

II-5.2) Autres traitements adjuvants testés en protocole de recherche

***** *Les molécules visant à limiter l'anémie palustre :*

Si les transfusions sanguines sont souvent effectuées lors d'un paludisme grave, leur utilisation en tant que traitements adjuvants n'est pas recommandée (428). L'érythropoïétine (EPO) est une hormone stimulant la production de GR au niveau de la moelle osseuse. Elle a des propriétés neuroprotectrice, anti-inflammatoire, antioxydante et anti-apoptotique. Des études ont montré qu'un niveau élevé d'EPO est corrélé à une diminution du déficit neurologique (122, 429, 430). Cependant, Dalko *et al* ont montré des résultats inverses lors d'une étude menée en Inde sur des patients atteints de neuropaludisme: le niveau d'EPO était positivement corrélé à la gravité palustre (152). Des recherches sont encore nécessaires afin de mieux évaluer le potentiel rôle bénéfique de cette hormone.

** Les molécules visant à diminuer la pression intra-crânienne et l'œdème cérébral :*

Les solutés de mannitol sont hypertoniques et créent un gradient osmotique permettant à l'eau de sortir des cellules. Par ce phénomène, ils permettraient de diminuer la pression intra-crânienne observée lors d'un neuropaludisme (431, 432). Cependant, des études réalisées sur

l'homme n'ont pas montré d'amélioration de la survie, le mannitol induirait même une augmentation du délai de coma et aggraverait donc l'évolution de la pathologie palustre (433–435).

** Les anticoagulants :*

En agissant comme anticoagulant, l'aspirine permet de limiter la formation de thrombus veineux liés à l'accumulation des GRi, GR sains et cellules de l'immunité dans les capillaires cérébraux (436). Cependant, une étude menée sur des patients atteints de paludisme grave a révélé que l'aspirine, tout comme l'héparine, ne provoque aucune amélioration clinique chez les patients et que la mortalité n'est pas diminuée (437). Une autre étude récente s'est intéressée à la sévuparine, un glycoaminoglycane aux propriétés similaires à l'héparine, chez des patients atteints de paludisme simple. Ce médicament a permis de diminuer l'invasion des parasites dans les GR sanguins (438).

Le défibrotide est un anti-thrombotique qui semble avoir un rôle protecteur au cours d'un ECM de par ses propriétés anticoagulantes mais également en bloquant l'expression de marqueurs d'activation à la surface des cellules endothéliales et en diminuant la production d'anion superoxyde (439, 440).

** Les molécules visant à inhiber la cytoadhérence et la séquestration :*

Le lévamisole aurait la propriété d'inhiber l'adhésion des GRi au récepteur CD36 présent à la surface de l'endothélium vasculaire, limitant alors la cytoadhérence et donc la séquestration des GRi dans les capillaires sanguins (441). Cependant, une étude menée sur des patients atteints de paludisme grave a montré que l'administration de lévamisole ne présentait aucun bénéfice quant à l'évolution de la pathologie (442). Ces résultats mettent en évidence la complexité des traitements visant à inhiber la cytoadhérence des GRi. En effet, le CD36 est exprimé à la fois par les cellules endothéliales et les monocytes/macrophages. Si dans le premier cas il permet l'adhérence des GRi aux micro-vaisseaux participant donc à la pathogénèse palustre, il permet également la phagocytose et l'élimination des GRi par les monocytes/macrophages, mécanisme essentiel à la résolution palustre (262, 271, 272).

De nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des aptamères (oligonucléotides synthétiques capables de fixer un ligand) sont actuellement étudiées afin d'inhiber la cytoadhérence des GRi aux cellules endothéliales et limiter le rosetting (en inhibant par exemple l'adhésion de la protéine *Pf*EMP1 à ses récepteurs) (443).

** Les molécules visant à réduire le stress oxydant :*

Le neuropaludisme est associé au développement d'un environnement pro-oxydant, souvent associé à la pathogénicité palustre (338, 444). La déféroxamine, et la défériprone sont des chélateurs de fer. Ils permettent donc de diminuer la quantité de Fer présent dans la circulation sanguine nécessaire à la reproduction du parasite et de réduire la production de ROS. S'ils permettent chez l'homme atteint de paludisme grave de limiter la parasitémie, ils sont néanmoins responsables de complications graves, voire parfois d'une augmentation de la mortalité (445).

La N-Acétyl-Cystéine (NAC) est un médicament possédant des propriétés antioxydantes par la stimulation de la production de glutathion (446). Des études menées chez l'homme ont montré que d'administration de NAC lors de paludismes graves, et notamment lors d'un neuropaludisme, n'avait aucun effet sur l'amélioration clinique ou la mortalité des patients (447–449).

Le curcumin possède des propriétés anti-inflammatoires mais également antioxydantes en piégeant les ROS et dérivés nitrés libres (450). Des études ont montré qu'il pourrait jouer un rôle protecteur dans la pathologie palustre chez la souris en réduisant la densité parasitaire et la mortalité des souris (451–453). Cependant, son manque de stabilité et sa métabolisation rapide compliquent son utilisation comme traitement adjuvant. Des études sont actuellement en cours afin de trouver de nouvelles formulations plus stables permettant de potentialiser ses propriétés anti-plasmodiales (454).

****** *Les molécules visant à augmenter le niveau de $NO^{\cdot}$:*

Le monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique ($NO^{\cdot}$), a été identifié pour son rôle protecteur au cours d'un paludisme grave (348, 349, 352, 354, 355). Le traitement par inhalation de $NO^{\cdot}$ lors d'un ECM a permis de réguler l'activation immunitaire et de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages, suggérant un rôle bénéfique dans la protection palustre (351). Chez l'homme, les résultats d'études cliniques sur le potentiel rôle protecteur d'un traitement par inhalation de $NO^{\cdot}$ chez des patients atteints de paludisme grave sont divergents. Si certaines études ne permettent pas de conclure quant à son rôle protecteur (455, 456), Bangirana *et al* ont récemment montré que les patients ayant reçu du NO. inhalé présentaient moins de symptômes neurologiques suggérant ainsi son rôle neuroprotecteur dans les formes graves de paludisme (457).

PARTIE 2 : TRAVAUX DE RECHERCHE

« Le plus grand stimulus pour travailler dans les études et la vie est le plaisir du même travail, le plaisir des résultats et la conscience de la valeur des résultats pour cette communauté. » Albert Einstein

INTRODUCTION

La première partie de cette thèse nous a permis de souligner l'importance des réponses immunitaires de l'hôte au cours de la pathologie palustre et le rôle central des monocytes/macrophages, cellules clés dans la régulation des balances pro/anti-inflammatoires et pro/antioxydantes. Cependant, la cinétique des évènements mis en jeu et l'implication différente des sous-populations monocytaires restent encore à éclaircir.

La seconde partie de cette thèse sera divisée en trois chapitres correspondant à mes différents travaux de recherche. Ces derniers ont pour objectif d'identifier les facteurs immunitaires de l'hôte à l'origine de la neuroinflammation et de sa résolution au cours du paludisme cérébral. Le rôle de chacune des trois sous-populations monocytaires sera étudié par différentes approches combinant la mise en point d'un modèle murin expérimental de paludisme cérébral et de sa résolution ainsi que deux études chez des enfants béninois atteints de différentes formes cliniques de paludisme.

Une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques mis en place au cours du neuropaludisme permettra d'identifier des facteurs de risque ou de protection associés à la gravité palustre et au devenir clinique des patients. De façon plus globale, nous espérons ainsi identifier de nouveaux marqueurs prédictifs du neuropaludisme permettant d'orienter la prise en charge du patient vers des traitements plus adaptés à sa cinétique d'infection.

I – Réponse monocytaire chez l'homme au cours du neuropaludisme, facteurs de risque et de résolution du neuropaludisme : Première étude menée chez les patients béninois présentant un paludisme simple, un neuropaludisme ou une anémie sévère palustre (2014-2016) : article Royo et al., Scientific Reports

I-1. Introduction

Cette étude porte sur la réponse immune cellulaire au cours d'un neuropaludisme. Nous avons formulé l'hypothèse qu'il existe un profil spécifique du neuropaludisme impliquant des facteurs socio-démographiques et des critères clinico-biologiques avec notamment une répartition et un état d'activation caractéristiques des différentes sous-populations de monocytes sanguins. La stratégie de cette étude repose sur la comparaison de trois groupes de patients béninois : 1/ neuropaludisme (CM), 2/ anémie sévère palustre (SMA, groupe contrôle de paludisme grave non cérébral sans tropisme particulier des parasites pour le cerveau), 3/ accès simple (UM). L'objectif principal est de définir la répartition et les principales caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des sous-populations de monocytes présents dans le sang en fonction de la sévérité de l'accès palustre et du devenir clinique des patients. Un second objectif s'attachera à identifier les liens entre les sous-populations monocytaires, la parasitémie et les niveaux plasmatiques de cytokines. La plupart des études sur le neuropaludisme ont été menées sur des modèles murins. Notre étude permettra de confirmer chez le patient les hypothèses proposées sur la souris et de déterminer quelle répartition et quelles caractéristiques phénotypiques des sous-populations de monocytes sont associées à la gravité palustre et au décès des patients atteints de neuropaludisme.

Ce projet a débuté en 2014 avec une première campagne de prélèvements au Bénin. A cette époque, je ne faisais pas encore partie du projet, je n'ai donc pas participé à cet échantillonnage. J'ai pris part à cette étude en avril 2016, lors de mon stage de Master que j'ai effectué au Bénin. J'ai ainsi pu participer à toute l'organisation technique et matérielle de

l'étude, aux réunions d'informations avec les équipes médicales, à la bonne gestion des stocks de matériels et de l'approvisionnement des centres de santé. Aidée par l'équipe présente au Bénin, j'étais également en charge du transport des échantillons des centres de santé jusqu'à notre laboratoire et des premières analyses (détermination des densités parasitaires, du taux d'hémoglobine, du groupe sanguin,…) avant de procéder à la séparation du plasma et des PBMC en vue du rapatriement des échantillons en France. Durant ma thèse, j'ai ensuite effectué toutes les analyses biologiques des échantillons (cytométrie en flux, ELISA, RT-qPCR) ainsi que les analyses statistiques, qui ont conduit à l'écriture d'un article publié en novembre 2019 dans Scientific Reports (458).

I-2. Matériels et méthodes

La partie « Matériels et méthodes » est décrite dans l'article Royo *et al*. Les informations ci-dessous viennent compléter celles de l'article.

** Site et population d'étude :*

Cette étude a été menée à partir d'une cohorte de patients béninois de moins de 5 ans atteints de différentes formes cliniques de paludisme (UM, SMA, CM) au cours de deux saisons de transmission (mai-juillet) en 2014 et 2016.

Le Bénin est un pays d'Afrique de l'ouest présentant un climat tropical chaud et humide avec une saison sèche et une saison des pluies favorable à la transmission palustre (environ 2 à 6 piqures infestantes d'anophèles / homme / mois (459, 460). En 2019, le pays compte environ 5 millions de cas et 7 000 décès estimés dont plus de 2 500 déclarés pour 12 millions d'habitants (11). Les données épidémiologiques indiquent que l'incidence et la mortalité dues au paludisme stagnent depuis plusieurs années dans le pays (1). Au Bénin, *P. falciparum* est responsable de la grande majorité des cas de paludisme, avec quelques infections à *P. malariae* et *P. ovale* (461). Selon l'OMS, environ 60 à 75% de la population aurait accès aux moustiquaires imprégnées d'insecticides. Le paludisme reste la 1ère cause de consultation et d'hospitalisation des enfants dans les centres de santé (respectivement 40% et 30% chez les enfants de moins de 5 ans) (462). L'incidence du neuropaludisme est d'environ 36% chez les moins d'un an et 19% chez les moins de 5 ans. Il est également responsable d'environ 3 % des décès chez les enfants de moins de 5 ans (1). En 2019, la chimioprévention du paludisme saisonnier pour les enfants de moins de 5 ans (CPS) a été mise en place dans le nord du pays où plus de 110 000 enfants ont ainsi recu au moins une dose de traitement préventif (11).

** Comité d'éthique et consentement :*

Avant son démarrage, cette étude a été acceptée par le Comité d'Ethique institutionnel de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) rattaché à l'Université d'Abomey Calavi du Bénin. Avant chaque inclusion, les parents ou tuteurs des enfants ont été informés de la conduite de l'étude (but du projet, participation volontaire, avantages et inconvénients pour le patient, confidentialité, modalités de conservation et de traitement des données, …) Après la signature d'un consentement libre et éclairé par les parents, les enfants présentant les critères d'inclusion de l'un des trois groupes cliniques (UM, SMA, CM) étaient inclus dans le projet.

** Critères de définition des groupes et déroulement de l'inclusion :*

Afin d'être inclus dans l'étude, certains critères étaient vérifiés chez l'ensemble des patients : 1/ âge < 5 ans, 2/ TDR et FS/GE positifs à *P. falciparum* 3/ TDR VIH négatif. Les critères de définition du groupe UM étaient la présence d'une fièvre > 37°C et une absence de signe de gravité, ceux du groupe SMA étaient un taux d'Hb ≤ 5 g/dl et une absence de signe neurologiques, et enfin ceux du groupe CM étaient un score de Blantyre ≤ 2 associé à une durée du coma d'au moins 6 heures et une absence d'autre cause de coma.

Un recrutement exhaustif des enfants a été réalisé pour répondre aux contraintes de temps et de terrain. L'inclusion des patients s'est déroulée en collaboration avec l'équipe soignante des services de pédiatrie et n'a pas interféré avec le fonctionnement habituel des centres de santé. A l'arrivée, les enfants étaient examinés cliniquement et un test de diagnostic rapide du paludisme (TDR) était réalisé. Pour chaque patient, un questionnaire a été rempli avec les parents afin de collecter les données sociales et les antécédents médicaux des patients (âge, sexe, hospitalisation antérieure, prise d'antipaludiques récente,…). Pour les paludismes graves, les taux d'Hb n'étant pas connus à l'inclusion, la répartition finale dans les groupes a été faite lors de l'analyse des données. Les patients inclus ont été pris en charge financièrement par le projet (frais d'hospitalisation et de traitement) et traités selon les recommandations nationales du Bénin (artéméther-luméfantrine pour les UM et artésunate IV pour les deux groupes de paludismes graves. Dès l'inclusion, à J0, environ 4mL de sang veineux périphérique ont été prélevés et un bilan biologique a été réalisé par les personnels de santé des centres médicaux. Ce bilan incluait les mesures classiques présentes dans un hémogramme ainsi que la glycémie. La détermination du groupe sanguin de l'enfant ainsi qu'un dosage de l'Hb ont également été effectués dans notre laboratoire.

** Séparation du plasma et des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) :*

Les plasmas des patients ont été séparés du sang total par centrifugation pour l'analyse des différentes cytokines. Les PBMC, cellules mononuclées retrouvées dans la circulation périphérique (correspondant aux globules blancs), ont été séparées du reste de l'échantillon par centrifugation en gradient de densité (Figure 16). Tous les échantillons de plasma et de PBMC ont ensuite été rapatriés en France pour des analyses biologiques (ELISA, cytométrie en flux, RT-qPCR).

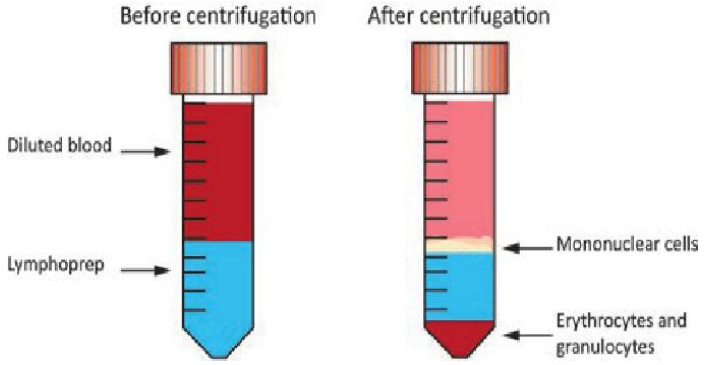


Figure 16 : Séparation des PBMC par centrifugation en gradient de densité (source : Ruber *et al*, 2015)

** Etude de la répartition et des principales caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des sous-populations monocytaires par cytométrie en flux :*

La cytométrie en flux permet de discriminer les cellules par leur taille (Forward Scatter, FSC), leur forme et leur granulosité (Side Scatter, SSC), leur viabilité, mais également par l'expression intra- ou extra-cellulaire de différents marqueurs reconnus par des anticorps couplés à des fluorochromes. Les données obtenues permettent ainsi de déterminer des pourcentages de différentes populations cellulaires (monocytes, LT et LB, cellules NK et NKT dans notre étude) ainsi que l'intensité de fluorescence des anticorps testés reflétant le niveau d'expression des marqueurs étudiés. Pour chaque échantillon de PBMC, 3 panels ont été réalisés : Panel 1 (analyse de l'ensemble des populations cellulaires immunitaires : CD3, CD4, CD8, CD25, CD56, CD19, CD14), Panel 2 (analyse des sous-populations de monocytes et de leur activation : CD14, CD16, TLR2, CD36, CCR2), Panel 3 (analyse de l'activation de LT CD8 : CD3, CD8, CD69, CXCR3). Le tableau 5 résume les populations cellulaires identifiées et les anticorps utilisés pour leur identification. La figure 1 de l'article montre la stratégie d'identification des 3 sous-populations de monocytes $CD14^{hi}$ $CD16^{+}$, $CD14^{+}$ $CD16^{+}$ et $CD14^{low}$ $CD16^{+}$.

Tableau 5 : Les différentes populations cellulaires étudiées et les anticorps utilisés pour leurs identifications par cytométrie en flux (Panel 1)

Types de cellules	LT	LT CD4	LT CD8	LT reg	Cellules NK	LB	Monocyte
Anticorps	CD3	CD4	CD8	CD25	CD56	CD19	CD14 CD16

** Dosages des niveaux plasmatiques des cytokines et des niveaux d'expression d'ARNm :*

Les concentrations plasmatiques d'IL-1β, IL-6, IL-10, CCL2 (ou MCP-1) et CXCL10 ont été mesurées par ELISA. Pour l'analyse génique, les monocytes ont été séparés des autres populations leucocytaires grâce à leur capacité d'adhésion au fond plastique des plaques de culture. L'ARNm a ensuite été extrait et les niveaux d'expression de différents gènes (*HLA-DR* et *CD86*, impliqués dans la présentation de l'antigène parasitaire et l'activation des lymphocytes, ainsi que *CCR2* et *CX3CR1*, impliqués dans le recrutement des monocytes/lymphocytes vers les sites inflammatoires) ont été mesurés par RT-qPCR.

** Analyse statistique :*

L'intégralité des données issues des questionnaires patients ainsi que les résultats des examens clinico-biologiques ont été vérifiés pour chaque patient. En cas de doute ou de disparité sur un critère, l'enfant a été retiré de l'analyse finale. Les variables définissant l'appartenance aux trois groupes cliniques ont été contrôlées et chaque enfant a été réparti dans son groupe clinique définitif. Les enfants ne respectant pas l'ensemble des critères définissant leurs groupes ont été retirés de l'étude. Les résultats des variables quantitatives ont été données en prenant en compte la médiane +/- les 25ème et 75ème percentiles. Les variables qualitatives ont quant à elles été exprimées sous forme de fréquences. Les tests U de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour établir les comparaisons de valeurs continues entre les groupes et le test du $\chi 2$ a permis de comparer les variables nominales. Le test de corrélation des rangs de Spearman a permis d'établir les corrélations entre deux variables continues, la valeur Rho indiquant le niveau de corrélation. Le taux de significativité des tests statistiques a été fixé à $p<0,05$.

Afin d'identifier les facteurs de risque et de protection du neuropaludisme, une régression linéaire (ou analyse univariée) a été conduite sur l'ensemble des variables socio-cliniques et biologiques. Les résultats sont exprimés en Odds Ratio bruts (OR), avec un intervalle de confiance à 95%. Suite à cette analyse, une régression logistique (ou analyse multivariée) a été effectuée afin de prendre en compte l'interaction des variables entre elles.

I-3. Résultats et discussions

I-3.1) *Article Royo et al : Changes in monocytes subsets are associated with clinical outcomes in severe malarial anaemia and cerebral malaria*

Ce paragraphe résume les principaux résultats de l'article présenté ci-dessous. Au total, 156 patients ont été recrutés et 133 enfants ont été inclus dans l'étude finale (42 CM, 29 SMA et 62 UM). Vingt-trois patients ont été exclus de l'étude (8 dans le groupe UM, 5 dans le groupe SMA et 10 dans le groupe CM) pour les raisons suivantes : parasitémie recomptée et négative (n=1), absence de prélèvement (n=5), âge supérieur à 5 ans (n=7), test VIH positif (n=2), score de Blantyre égal à 3 (n=8). Nos résultats indiquent que de forts niveaux plasmatiques d'IL-1β et de CCL2, une forte expression de *CCR2* et *CX3CR1* et une faible expression de *HLA-DR* par les monocytes sont spécifiquement associés au neuropaludisme. La production plasmatique d'IL-1β, IL-6, IL-10 et CXCL10 ainsi qu'une surexpression de *CCR2* et une inhibition de *HLA-DR* ont été associées au décès des patients.

L'analyse de la répartition des différentes sous-populations monocytaires a mis en évidence le rôle des monocytes non-classiques dans la protection vis-à-vis des formes sévères de paludisme (CM, SMA). De plus, une diminution du pourcentage de cette sous-population et une augmentation de celui des monocytes classiques étaient associées au décès des patients. Les pourcentages de monocytes non-classiques étaient été inversement corrélés à la densité parasitaire, à la production plasmatique d'IL-6, IL-10, CCL2 et CXCL10, et à l'expression de *CX3CR1* et *CCR2*. De plus, une plus forte expression du récepteur CD36 par les trois populations monocytaires, pourtant majoritairement exprimé par les sous-populations classiques et intermédiaires, était associée au paludisme simple. Son expression par les monocytes classiques était également associée à la survie des patients. L'expression du récepteur CD16 par les monocytes intermédiaires et non-classiques était quant à elle associée au paludisme simple et à la survie des patients. Ces résultats suggèrent une implication des récepteurs CD36 et CD16 dans la protection vis-à-vis du neuropaludisme et du décès des patients dus au paludisme.

I-3.2) Résultats annexes (non publiés) *:*

** Analyse des données sociales et clinico-biologiques :*

Les données socio-cliniques des patients constituent un aspect important de cette étude menée chez des enfants béninois. Une partie de ces variables a été discutée dans l'article, d'autres, issus uniquement de la cohorte 2016, sont présentées dans le tableau 6. Il est important de noter que certaines de ces données ont été recueillies via les questionnaires posés aux parents, la collecte de ces informations constitue donc un recueil rétrospectif de données dont la véracité n'est pas garantie et dont les résultats doivent être interprétés avec précaution.

Néanmoins, la comparaison de ces variables entre les trois groupes cliniques issus de la cohorte 2016 indique que le pourcentage d'enfants ayant connus au moins une hospitalisation antérieure pour paludisme était plus élevé dans le groupe UM par rapport au groupe SMA et CM (respectivement 40,7% 7,7% et 23,1%). Ce résultat peut s'expliquer par un âge plus avancé des patients UM comparé au groupe SMA (p=0.036) bien qu'aucune différence n'ait été observée entre l'âge des patients UM et CM. Aucune différence significative n'a été observée pour la comparaison entre les groupe du nombre d'enfants ayant pris un traitement antipaludique les jours précédents leur hospitalisation. Cependant, le pourcentage d'enfants ayant pris un traitement antérieur à l'hospitalisation autre qu'un antipaludique (principalement antibiotique, mais également tisane, fer, calmant, antiémétique) était multiplié par 2,5 ou plus entre le groupe UM et les deux formes graves (avec 35% pour les UM, 87,5% et 91,0% pour les SMA et CM, respectivement). Enfin, aucune différence n'a été observée dans l'utilisation de moustiquaires imprégnées entre les groupes, ni lors de l'analyse de la durée de la fièvre chez l'enfant avant hospitalisation entre les groupes SMA et CM. A l'inclusion, le poids était similaire d'un groupe à l'autre. Le pourcentage de patients présentant un ictère lors de leur admission à l'hôpital était de 9,5% contre 40% dans les groupes SMA et CM respectivement. Le nombre de GR et l'hématocrite dans le sang des patients atteints de paludisme sévère étaient largement inférieurs aux valeurs normales indiquées pour un enfant sain (valeurs comprises entre $4{,}0.10^6$ et $5{,}5.10^6$ GR/mm^3 et hématocrite entre 36 et 45%). Enfin, une différence significative a été observée entre les 3 formes cliniques en comparant la proportion de chaque groupe sanguin. En effet, 60% des UM était du groupe O alors que le pourcentage était de 38,5% chez les SMA et 44,4% chez les CM. Ce dernier résultat est en accord avec plusieurs études suggérant que le groupe sanguin O apporte une certaine protection contre le paludisme grave (78, 79).

** Analyse des différentes populations immunitaires par cytométrie en flux :*

Lors de l'analyse des populations immunitaires par cytométrie en flux, nous nous sommes intéressés à la répartition des différentes populations cellulaires (panel 1), l'activation des monocytes (panel 2, décrit dans l'article) et l'activation des LT CD8 (panel 3). L'analyse des panels 1 et 3 sont présentés dans les tableaux 7a et 7b. Comme le montre le tableau 7a, aucune différence n'a été observée dans la répartition des monocytes, LT régulateurs, LB, cellules NK et NKT entre les 3 formes cliniques. En revanche, le pourcentage de LT présents dans la circulation périphérique était significativement inférieur pour les deux formes de paludisme grave comparé au groupe UM. Parmi les LT, la répartition des LT CD8 ne semble pas discriminer un groupe des deux autres formes cliniques, cependant, un faible pourcentage de LT CD4 était caractéristique du groupe SMA. Les LT CD8+ sont connus pour jouer un rôle central dans le mécanisme physiopathologique du neuropaludisme chez la souris. Des études sur des modèles murins de paludisme cérébral montrent un recrutement et une infiltration de LT CD8+ dans les cerveaux des souris infectées, induisant des dommages irréversibles et pouvant alors expliquer les séquelles neurologiques observées dans cette pathologie (124, 463). Le rôle des LT CD8+ dans la physiopathologie du neuropaludisme et leur localisation au niveau du cerveau a été récemment confirmés chez des enfants malawites, bien que les proportions relatives des différentes populations cellulaires n'aient pas été étudiées dans ce travail (464). Ainsi, le faible pourcentage de LT CD8 en périphérie pourrait s'expliquer par une localisation de ces cellules au niveau cérébral chez les sujets CM. Cependant, cela est peu probable pour le groupe SMA, mais ces LT CD8+ pourraient être dans ce cas localisés massivement dans la rate pour éliminer les GRi, créant ainsi une forte anémie, comme suggéré par des résultats obtenus dans un modèle de rat (465).

Le panel 3 s'intéresse à la répartition des LT et leur état d'activation (Tableau 7b). L'analyse des lymphocytes en cytométrie a permis de distinguer deux populations, des LT $CD3^{low}$ (correspondant à des LT immatures), et des LT $CD3^{hi}$ (LT matures). Contrairement aux LT $CD3^{hi}$, les LT $CD3^{low}$ étaient plus nombreux dans les formes graves que dans le groupe UM. Ce résultat suggère un potentiel blocage de la maturation des LT dans les formes sévères du paludisme et pourrait également participer au plus faible pourcentage de LT CD8 chez les patients des groupes SMA et CM. Hviid *et al* ont montré une faible expression de CD3 par les LT chez des sujets CM comparativement à des sujets UM (466). Les auteurs ont conclu à un état « d'hyporéponse » des LT pendant la phase aigüe de l'accès, rejoignant notre interprétation. Enfin, un fort pourcentage de LT CD8 exprimant le marqueur d'activation CD69 était spécifique des SMA. Au contraire, un faible pourcentage de LT CD8 exprimant

CXCR3 (récepteur des chimiokines CXCL9 et CXCL10) était observé pour les formes de paludisme sévère. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle délétère de CXCR3 lors d'un paludisme cérébral chez la souris au cours duquel une augmentation de son expression à la surface des lymphocytes circulants était observée (329, 331, 467). Des études plus précises sont nécessaires afin de déterminer le rôle exact de CXCR3 dans la pathologie palustre.

Tableau 6 : Données sociales et clinico-biologiques des trois groupes de patients présentant un paludisme simple (UM), une anémie sévère palustre (SMA) ou un neuropaludisme (CM), Bénin 2016

	UM		**SMA**		**CM**		**p**	**p**	**p**	**p**
	n	n total = 32	n	n total = 29	n	n total = 13	(UM/SMA)	(UM/CM)	(SMA/CM)	
Antériorité d'hospitalisation pour paludisme	27	40.7	26	7.7	13	23.1	**0.005**†	ns†	ns†	**0.0194**†
Ttt antipalu reçu les jours précédents	25	24	24	29.2	12	25	ns†	ns†	ns†	ns†
Ttt reçu les jours précédents hors antipalu	20	35.0	24	87.5	11	91.0	**0.0003**†	**0.0028**†	ns†	**0.0002**†
Moustiquaire imprégnée	26	84.6	23	91.3	8	87.5	ns†	ns†	ns†	ns†
Fièvre avant J0 (jours)	DM	DM	26	5 (4-6)	11	4 (3-7)	DM	DM	ns†	DM
Tableau clinique à J0										
Poids (kg)	18	12.0 (10.0-16.0)	26	10.4 (8.5-13.0)	11	12.0 (9.4-13)	ns*	ns*	ns*	ns$^{\$}$
Ictère	DM	DM	21	9.5	10	40	DM	DM	**0.045†**	DM
Biologie à J0										
GR (/mm^3 x .10^6)	DM	DM	22	1.81 (1.49-2.25)	4	2.45 (1.75-3.49)	DM	DM	ns*	DM
Hématocrite (%)	DM	DM	19	14 (12-16)	4	16 (15-17)	DM	DM	ns*	DM
Groupe sanguin	25		26		9		ns† / ns†#	**0.025† / 0.0019†#**	ns† / **0.0277†#**	ns† / **0.0068†#**
O+	14	56	9	34.62	0	0				
B+	5	20	7	26.92	4	44.4				
A+	4	16	6	23.08	5	55.6				
O-	1	4	1	3.84	0	0				
AB+	1	4	2	7.69	0	0				
AB-	0	0	1	3.85	0	0				

Ttt = traitement, GR = globules rouges ; DM = donnée manquante
Variables quantitatives : médiane (25ème-75ème percentiles) ; Variables qualitatives : pourcentage
*Test de Mann-Whitney ; †Test du Chi^2 ; $^{\$}$Test de Kruskal-Wallis ; ns = non significatif ; seuil de significativité p<0.05
Test du Chi^2 entre les patients O (O+ et O-) et l'ensemble des autres groupes sanguins (A+/B+/AB+/AB-)

Tableau 7a : Etude de la répartition des différentes populations cellulaires par cytométrie en flux en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

Panel 1	Critère de comparaison	UM vs SMA*		UM vs CM*		SMA vs CM*		UM vs SMA vs CM$	
		Résultat	P	Résultat	P	Résultat	P	Résultat	P
Répartition des différentes populations	Lymphocytes B (%)		ns		ns		ns		ns
	Cellules NK (%)		ns		ns		ns		ns
	Lymphocyte NKT (%)		ns		ns		ns		ns
	Lymphocytes T (%)	UM > SMA	0.0022	UM > CM	0.0059		ns	**UM > SMA et CM**	**0.0015**
	Lymphocytes T CD8 (%)	UM < SMA	0.0396		ns		ns		ns
	Lymphocytes T CD4 (%)	UM > SMA	<0.0001		ns	CM > SMA	0.0015	**SMA < UM et CM**	**<00001**
	Lymphocytes T reg (%)		ns		ns		ns		ns

* Test de Mann-Whitney ; $ Test de Kruskal-Wallis. ns = non significatif

Tableau 7b : Etude de l'activation des LT CD8 par cytométrie en flux, en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

Panel2	Critère de comparaison	UM vs SMA*		UM vs CM*		SMA vs CM*		UM vs SMA vs CM$	
		Résultat	P	Résultat	P	Résultat	P	Résultat	p
Activation des T CD8	**CD8 CD69 (%)**	UM < SMA	0.0391		ns	CM < SMA	0.0249	**SMA > UM et CM**	**0.0439**
	CD8 CXCR3 (%)	UM > SMA	0.0055	UM > CM	0.0390		ns	**UM > SMA et CM**	**0.01**
	CD3low (%)	UM < SMA	0.0045	UM < CM	0.0258		ns	**UM < SMA et CM**	**0.0063**
	CD3hi (%)	UM > SMA	0.0028	UM > CM	0.0224		ns	**UM > SMA et CM**	**0.0042**

* Test de Mann-Whitney ; $ Test de Kruskal-Wallis. ns = non significatif

I-4. Conclusion

Cette étude permis de mettre en évidence pour la première fois le rôle protecteur des monocytes non-classiques dans la physiopathologie des formes graves de paludisme (SMA et CM) chez l'homme. En effet, un faible pourcentage de monocytes non-classiques était associé à la sévérité palustre et au décès des patients. De plus, une diminution de l'expression des récepteurs CD16 et CD36, impliqués dans la phagocytose opsonique (CD16) et non-opsonique (CD36) des GRi par les monocytes dans la circulation périphérique a été observée lors des formes sévères de paludisme. La diminution de leur expression à la surface des monocytes traduit une capacité limitée à promouvoir l'élimination des GRi par phagocytose, particulièrement lors d'un le neuropaludisme. Cependant, le récepteur CD36 a d'autres fonctions, notamment celle de reconnaitre et d'éliminer les cellules apoptotiques, processus nécessaire à la résolution de l'inflammation (468, 469) qui pourrait également jouer un rôle dans la résolution du neuropaludisme.
L'ensemble de ces résultats devra être confirmé par des études complémentaires impliquant une cohorte plus importante et un suivi de meilleure qualité afin de pouvoir étudier les facteurs d'amélioration clinique. C'est en partie ce que nous nous sommes attachés à faire au cours du projet NEUROCM présenté dans la partie III du document.

La compréhension des mécanismes physiopathologiques lors d'un neuropaludisme chez l'homme repose en partie sur des corrélations effectuées sur des paramètres dosés dans la circulation périphérique, mais également sur quelques études post-mortem et autopsies (470). Le problème majeur réside donc dans l'inaccessibilité du cerveau et l'impossibilité d'étudier les mécanismes physiopathologiques mis en œuvre dans cet organe au cours du neuropaludisme. Une première solution a été amenée grâce à l'examen microscopique du fond d'œil permettant de diagnostiquer les rétinopathies observées lors d'un neuropaludisme chez l'homme. La sévérité de la rétinopathie est prédictive des séquelles neurologiques observées chez les enfants ayant survécus à un neuropaludisme (471). Cette technique permet de discriminer les comas causés par le neuropaludisme des comas issus d'autres pathologies et de visualiser les dommages vasculaires et la séquestration des GRi (472–474). Le développement de nouvelles techniques d'imagerie cérébrale a également permis de mieux appréhender les évènements mis en place dans les cerveaux de patients. Cependant ces techniques ne permettent pas la compréhension des mécanismes immunopathologiques mis en œuvre à l'échelle cellulaire et moléculaire.

Les études menées en parallèle sur des modèles murins de paludisme cérébral (ECM) sont donc essentielles pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans le cerveau au cours d'une infection palustre et de sa résolution.

SCIENTIFIC REPORTS
nature research

OPEN

Changes in monocyte subsets are associated with clinical outcomes in severe malarial anaemia and cerebral malaria

Jade Royo[1], Mouna Rahabi[1], Claire Kamaliddin[2], Sem Ezinmegnon[3], David Olagnier[4], Hélène Authier[1], Achille Massougbodji[3], Jules Alao[5], Yélé Ladipo[5], Philippe Deloron[2], Gwladys Bertin[2], Bernard Pipy[1], Agnès Coste[1] & Agnès Aubouy[1]*

Monocytes are plastic heterogeneous immune cells involved in host-parasite interactions critical for malaria pathogenesis. Human monocytes have been subdivided into three populations based on surface expression of CD14 and CD16. We hypothesised that proportions and phenotypes of circulating monocyte subsets can be markers of severity or fatality in children with malaria. To address this question, we compared monocytes sampled in children with uncomplicated malaria, severe malarial anaemia, or cerebral malaria. Flow cytometry was used to distinguish and phenotype monocyte subsets through CD14, CD16, CD36 and TLR2 expression. Data were first analysed by univariate analysis to evaluate their link to severity and death. Second, multinomial logistic regression was used to measure the specific effect of monocyte proportions and phenotypes on severity and death, after adjustments for other variables unrelated to monocytes. Multivariate analysis demonstrated that decreased percentages of non-classical monocytes were associated with death, suggesting that this monocyte subset has a role in resolving malaria. Using univariate analysis, we also showed that the role of non-classical monocytes involves a mostly anti-inflammatory profile and the expression of CD16. Further studies are needed to decipher the functions of this sub-population during severe malaria episodes, and understand the underlying mechanisms.

The two primary severe disease outcomes of malarial infection are cerebral malaria (CM) and severe malarial anaemia (SMA). Case fatality rates among African children with CM remain in the 15–25% range[1–3] while reported mortality rates for SMA are consistently lower than for CM but vary notwithstanding from 1.4% to 22%[4,5]. Pathophysiology of CM is based on the accumulation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes (iE) in the brain and clinically develops into coma[6]. Infected red blood cells adhere to vascular endothelium and other erythrocytes, cause ischemia and hypoxia, elicit endothelial activation and signalling, blood brain barrier impairment and a range of immune cell host responses to resolve the neuroinflammation process[7,8]. Here, monocytes play a central role in secreting immune cytokines, chemokines and reactive oxygen species, participating in immune cell chemoattraction and polarization and in the redox balance[9,10]. SMA is defined by a haemoglobin level of < 5 g/dL. Its aetiology is attributed to the lysis of infected and uninfected red blood cells with anaemia persisting even after successful clearance of parasitemia[11–13]. Dyserythropoiesis and bone marrow suppression explain the low replacement of red blood cells[14–16]. Early Ei elimination by monocyte/macrophages-dependent phagocytosis and reactive oxygen species production drives both the inflammatory response and inhibition of erythropoiesis, while accumulation of hemozoin-containing monocytes has been linked to suppression of erythropoiesis[17].

Human monocytes are identified by their lipopolysaccharide receptor CD14, a co-receptor for lipopolysaccharide (LPS) which is abundantly expressed. Inflammatory activity of monocytes expressing CD16, a Fcγ receptor,

[1]PHARMADEV UMR 152, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Université Paul Sabatier Toulouse 3, Toulouse, France. [2]MERIT UMR 216, IRD, Université Paris 5, Sorbonne Paris Cité, Paris, France. [3]Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et l'Enfance (CERPAGE), Cotonou, Benin. [4]Aarhus University, Department of Biomedicine, Research Center for Innate Immunology, Aarhus C, 8000, Denmark. [5]Paediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, Benin. *email: agnes.aubouy@ird.fr

	UM		SMA		CM		*P* value[b,c]
no. of patients	n	62	n	29	n	42	
Age (months)[a,b]	61	30 (18.0–48.0)	27	30.0 (13.7–48.0)	42	32.5 (18.0–48.0)	0.87
Ratio F/M[c]	62	30/32	27	13/14	42	18/24	0.84
Previous hosp. (%)[c]	27	11 (40.7)	26	2 (7.7)	42	4 (9.5)	**0.0012**
Axillary temp.[a,b]	46	37.6 (37.1–38.0)	23	38.0 (37.4–39.0)	41	38.5 (37.9–39.0)	**0.0005**
Seizure (%)[c]	62	0	24	5 (20.8)	42	24 (57.1)	**<0.0001**
Blantyre score[a,b]	62	5 (5–5)	25	5 (4–5)	42	2.0 (1.0–2.0)	**<0.0001**
Glycemia[a,b]	15	0.9 (0.9–1.0)	12	0.9 (0.4–1.2)	36	0.8 (0.3–1.2)	0.92
Hemoglobin[a,b]	21	10.7 (9.6–12.1)	28	4.1 (3.5–4.6)$^{***,\$\$\$}$	41	5.2 (4.1–6.6)	**<0.0001**
Parasite density (/µL of blood)[a,b]	60	2,684 (645–16,588)	29	2,182 (635–34,763)	42	302,534 (15,375–1,346,960)$^{\$\$\$,\$\$\$}$	**<0.0001**
Death (%)[c]	62	0	27	2 (7.4)	37	15 (40.5)$^{\$\$\$,\$\$}$	**<0.0001**
Plasm. IL-1β[a,d]	54	0 (0–4.7)	28	0 (0–0)	36	33.6 (0–58.4)$^{\$\$\$,\$\$\$}$	**<0.0001**
Plasm. IL-6[a,d]	45	5.3 (0–19.4)	25	38.0 (10.1–185)***	36	78.0 (28.0–164)$^{\$\$\$}$	**<0.0001**
Plasm. IL-10[a,d]	61	78.3 (10.1–392)	28	565 (279–2,076)***	36	895 (407–1,675)$^{\$\$\$}$	**<0.0001**
Plasm. MCP-1[a,d]	59	150 (96.4–291)	27	150 (78.9–475)	36	234 (141–702)$^{\$,\$}$	**0.03**
Plasm. CXCL10[a,d]	44	251 (76.6–778)	25	657 (449–857)*	36	794 (422–1534)$^{\$\$\$}$	**0.0002**

Table 1. Baseline characteristics of patients according to clinical groups and univariate analysis of risk factors of malaria severity. [a]Median value (interquartile range), [b]Quantitative variables were compared between groups using the Kruskal-Wallis test, [c]Categorized variables were compared using a chi-square test, [d]In pg/mL. Two-by-two comparisons between quantitative variables were tested by the Mann Whitney U-test and indicated by *for UM versus SMA, $^{\$}$for UM versus CM and $^{\$}$for SMA versus CM. One symbol means $P < 0.05$, two symbols $P < 0.005$ and 3 symbols $P < 0.0005$.

was recognized many years ago[18–20], which has led to studies demonstrating the heterogeneity of monocytes[21]. Now, human monocytes are divided in three subsets based on both CD14 and CD16 expression, named classical ($CD14^{+}$ $CD16^{-}$), intermediate ($CD14^{+}$ $CD16^{+}$) and non-classical ($CD14^{low}$ $CD16^{+}$). According to their response to LPS stimulation, classical monocytes are known for their major function of phagocytosis with capacity to produce IL-10 and low TNF; intermediate monocytes are known as inflammatory cells with high capacity to produce IL-1β and TNF; and non-classical monocytes are cells patrolling in vessels able to differentiate into anti-inflammatory macrophages during inflammation[22]. However, during pathological processes, the effect of count change remains unclear. We earlier established that proportions and phenotypes of monocyte subsets are related to clinical outcomes in pregnancy-associated malaria[23]. In that study, $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ non-classical monocytes increased in comparison to reported proportions of healthy pregnant women, and increased expression of the CD36 scavenger receptor on monocytes was related to higher infant birth weight.

In the current study, we postulated that proportions and phenotypes of circulating monocyte subsets can be a marker of severity or death outcome in children with malaria. To verify this hypothesis, we compared monocytes sampled in children with uncomplicated malaria (UM), SMA or CM. To define monocyte phenotypes, we studied the scavenger receptor CD36 and the Toll-like receptor 2 (TLR2), two pattern recognition receptors known for their functional implication in iE elimination[24–28]. The relationship between monocyte subsets and levels of cytokines, plasma chemokines, and chemokine receptor expression was also investigated. Proportions and phenotypes of monocytes were first analysed by univariate analysis to evaluate their link to severity and death outcome. Second, multinomial logistic regression was used to measure the specific effect of monocyte proportions and phenotypes on severity and death, after adjustment for other variables unrelated to monocytes. Our results highlight the importance of non-classical monocytes in outcomes of severe malaria in children (CM and SMA). Multivariate analysis shows that a decreased percentage of non-classical monocytes is associated with death. Using univariate analysis, we also clarify the relationship of CD14, CD16, CD36 and TLR2 expression by monocyte subsets with severity and death outcomes.

Results

Baseline characteristics of patients and relation to severity and death occurrence. A total of 133 patients were enrolled and divided in 42 CM, 29 SMA and 62 UM (Table 1). Blood samples were drawn immediately at inclusion. Not all measures could be assessed in every patient because of early death or low volumes of sampled blood. The characteristics of the patients included in this study are shown in Table 1. Median ages and female/male ratio were similar. Previous hospitalization was more frequent in the UM group ($P = 0.001$). Axillary temperature was higher in both severe groups ($P = 0.0005$). In agreement with inclusion criteria, seizures were more frequent and Blantyre score was lower in CM ($P < 0.0001$). Similarly, haemoglobin was lower in SMA children ($P = 0.0002$ for SMA compared to CM, $P < 0.0001$ for SMA compared to UM by Mann-Whitney U-test). Children presenting with CM were characterized by much higher parasite densities and death occurrence compared to SMA and UM children ($P < 0.0001$ for all comparisons except for death in CM versus SMA, $P = 0.003$ by Mann-Whitney U-test). Plasma IL-1β, IL-6, IL-10, MCP-1 and CXCL10 were also associated with severity. IL-1β and MCP-1 were specifically higher in the CM patients (see Table 1). IL-6, IL-10 and CXCL-10 were similar in CM and SMA patients while these two severe groups presented higher levels than UM patients (see Table 1).

	Survival		Death		*P* value[b,c]
no. of patients	n	109	n	17	
Age (months)[a,b]	108	32.0 (18.0–48.0)	15	36.0 (18.7–48.0)	0.62
Ratio F/M[c]	108	50/58	16	10/6	0.23
Previous hosp. (%)[c]	73	16 (21.9)	15	1 (6.7)	0.17
Axillary temp.[a,b]	89	38.0 (37.3–38.8)	14	38.5 (37.8–39.0)	0.08
Seizure (%)[c]	107	19 (17.8)	15	6 (40.0)	**0.05**
Blantyre score[a,b]	108	5 (4–5)	15	1 (1–2)	**<0.0001**
Glycemia[a,b]	49	0.90 (0.67–1.12)	12	0.32 (0.17–1.34)	0.25
Hemoglobin[a,b]	68	5.1 (4.1–9.5)	16	5.0 (3.9–6.9)	0.35
Parasite density (/µL of blood)[a,b]	107	5,533 (841–50,402)	17	40,000 (4,154–1,510,000)	**0.008**
Plasm. IL-1β[a,d]	97	0 (0–12.1)	14	42.4 (5.4–116)	**0.0008**
Plasm. IL-6[a,d]	85	12.9 (1.3–83.3)	14	103 (42.5–199)	**0.001**
Plasm. IL-10[a,d]	104	341 (38–1125)	14	860 (617–1690)	**0.008**
Plasm. MCP-1[a,d]	101	156 (102–345)	14	325 (146–1,641)	0.06
Plasm. CXCL10[a,d]	84	531 (218–884)	14	1232 (574–1849)	**0.002**

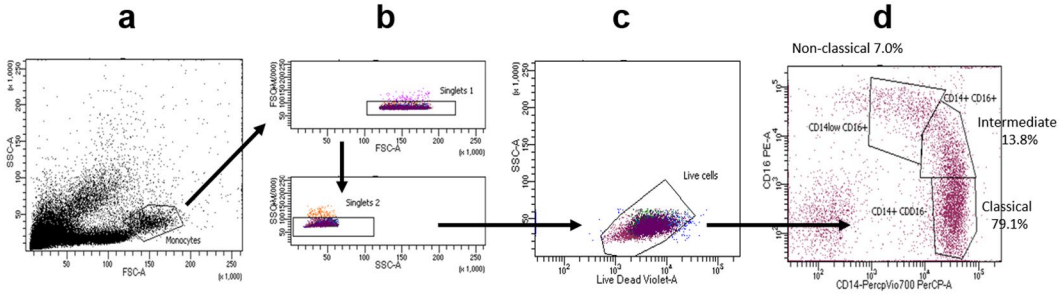
Table 2. Univariate analysis of risk factors of malarial death among baseline variables. [a]Median value (interquartile range), [b]Quantitative variables were compared between groups using the Kruskal-Wallis test, [c]Categorized variables were compared using a chi-square test, [d]In pg/mL.

Risk factors of malarial death were also studied by univariate analysis of baseline variables (Table 2). Table 2 shows that seizure occurrence, lower Blantyre score, higher parasitaemia and higher plasma IL-1β, IL-6, IL-10 and CXCL-10 are risk factors of death in this study ($P < 0.0001$, $P = 0.008$, $P = 0.002$, $P = 0.0008$, $P = 0.001$, $P = 0.008$, $P = 0.002$ respectively). Since the death group consists of only 17 patients (12 to 17 according to the parameter) compared to 109 in the survivor group (49 to 108 according to the parameter), the results should be interpreted with caution.

Proportions of monocyte subtypes and relation to malarial severity and death. To distinguish and define CD14 CD16 monocyte subsets, we used flow cytometry (Fig. 1). To ensure that our analyses were not due to cell death, we compared the percentages of live cells between clinical groups and by clinical outcome. The percentage of live cells was slightly higher in the SMA group compared to UM and CM groups ($P = 0.02$ and $P = 0.01$, respectively), but percentages were similar between survival and death groups (Fig. 1e). The percentages of monocyte subsets were compared according to the clinical group (UM, SMA or CM), and to the vital prognosis (Fig. 2). Percentages of classical and intermediate monocytes were similar in all three clinical groups (Fig. 2a). Conversely, the decreased percentage of non-classical monocytes was notably related to severity and to death occurrence (Fig. 2a,b). Higher percentages of classical $CD14^{+}$ $CD16^{-}$ monocytes were also related to the death outcome (Fig. 2b). Compared to healthy children[29], the percentage of classical monocytes in the three groups of malarial subjects appeared to be much lower (Fig. 2c). Conversely, the percentage of intermediate monocytes appeared to be much higher in malaria-infected children (Fig. 2c). For non-classical monocytes, their percentage appeared higher in the UM group, similar in the SMA group and lower in the CM group, in comparison to healthy subjects, although these observations are not based on any statistical tests (Fig. 2c).

Monocyte subtypes, plasma cytokines and parasitaemia. As monocyte subtypes are also described by their functional capacity to produce cytokines, chemokines, to migrate and to limit microbe multiplication, we studied the potential correlations between monocyte percentages and parasite density, plasma cytokines, chemokines and chemokine receptors (Fig. 3). Interestingly, only the proportion of non-classical monocytes showed an inverse correlation with parasite density ($Rho = -0.33$, $P = 0.002$, Fig. 3c). Proportions of intermediate monocytes presented positive correlations with the pro-inflammatory cytokines IL-1β (Fig. 3b) although Rho value was quite low (<0.3). Conversely, proportions of non-classical monocytes presented strong inverse correlations with plasma IL-6, IL-10, MCP-1, CXCL10, and to a lesser extent with CX3CR1 and CCR2 mRNA (see Fig. 3c).

Monocyte surface markers and relation to malarial severity and death. We next studied the expression of a panel of monocyte receptors involved in various monocyte functions. Expression of CD14, CD16, CD36 and TLR2, important markers for both innate and adaptive immunity, was evaluated by flow cytometry (Table 3, Figs. 4, 5). Expression of the chemokine receptors CX3CR1 and CCR2, involved in monocyte trafficking, was measured by RT-qPCR, as well as HLA-DR and CD86 expression, two receptors implicated in T cell priming (Fig. 6). The Table 3 presents the level of expression of CD14, CD16, CD36 and TLR2 according to the monocyte subtype. Classic monocytes were characterised by high CD14 and CD36 expression in comparison to non-classical monocytes, and lower TLR2 in comparison to intermediate monocytes. Intermediate monocytes also presented high CD14 and CD36 expressions, the highest TLR2 expression, and a lower expression of CD16 in comparison to non-classical monocytes. Finally, non-classical monocytes were characterised by lower CD14, CD36 and TLR2 by higher CD16 expression (Table 3). We next studied the relationship between the expression of these receptors and severity and death. For classical monocytes, CD14 and CD36 expression was inversely related



e

	UM	SMA	CM		Survival	Death
	n = 52	n = 23	n = 32		n = 92	n = 11
Live cells %	63.4 ± 3.9	78.3 ± 4.1*	66.7 ± 4.1		68.3 ± 2.6	67.4 ± 8.0

* SA versus UM, P = 0.02; SA versus CM, P = 0.01

Figure 1. Gating strategy for the identification of monocyte sub-populations by flow cytometry. Forward and side scattering areas (FSC-A and SSC-A) were first used to gate monocytes among other leucocytes (**a**). Doublets were removed by gating on forward-scatter-width (FSC-W) versus FSC-A and side-scatter-width (SSC-W) versus SSC-A (**b**). Dead cells were excluded from the single-cell population (**c**). Monocytes were subdivided into CD14+CD16−/CD14+CD16+/CD14low CD16+, according to CD14 and CD16 staining characteristics (**d**). Percentages of live cells are indicated according to the clinical group or the clinical outcome and values were compared by the Mann-Whitney U-test (**e**).

to severity, with lower MFIs in CM compared to SMA and UM (Fig. 4a). Conversely, TLR2 expression was higher in CM children than in UM children (Fig. 4a). For intermediate monocytes, CD14, CD16 and CD36 expression was also inversely related to severity with a lower expression in CM subjects compared to UM subjects (Fig. 4b). Finally, CD16 and CD36 are the two markers whose expression is related to severity for non-classical monocytes. Both were inversely related to severity with lower expression in CM subjects compared to UM subjects (Fig. 4c).

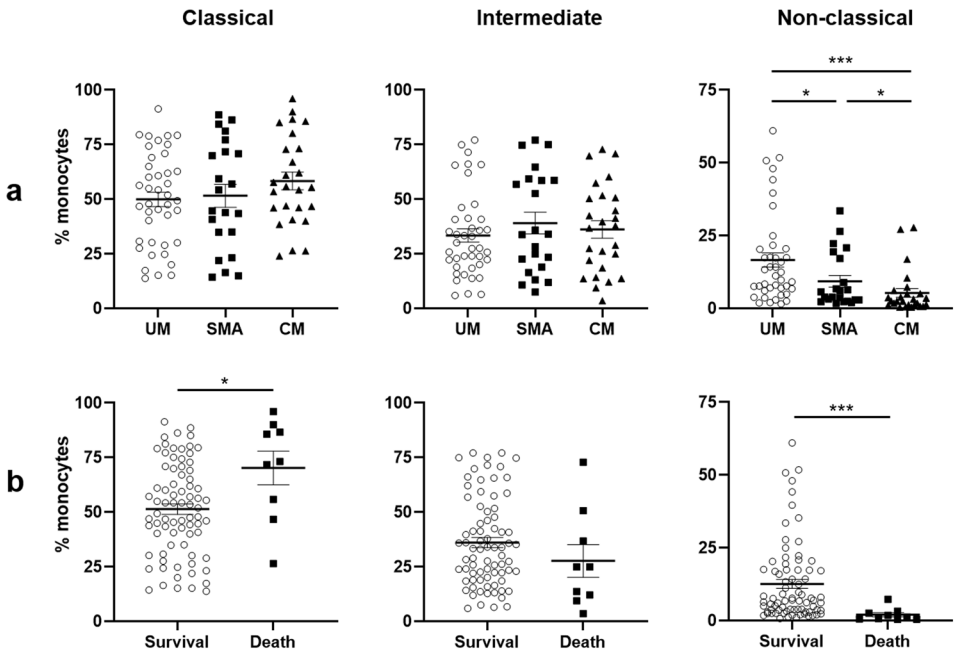
Regarding death occurrence, higher CD14 and CD36 expression by classic monocytes was associated with survival (Fig. 5a). Higher CD16 expression by both intermediate and non-classical monocytes was also related to survival (Fig. 5b,c). TLR2 expression was similar in children who died or survived regardless of the monocyte subtype (Fig. 5a–c).

Interestingly, CX3CR1 and CCR2 mRNA were overexpressed in monocytes from CM patients compared to UM and SMA (Fig. 6a), and such overexpression was also associated with death occurrence although for CX3CR1 we observed a non-significant trend (Fig. 6b). We noted that monocytes from SMA patients expressed less CX3CR1 and CCR2 than the two other groups (Fig. 6a). For CD86 mRNA expression, the profile is similar to that of CX3CR1 and CCR2, although the difference between CM and UM groups, and death and survival, is only a trend (Fig. 6a,b). Finally, monocytes from CM patients expressed less HLA-DR compared to UM and SMA monocytes (Fig. 6a) and this under-expression was associated with death occurrence (Fig. 6b).

Logistic regression analysis for the identification of risk factors of malarial severity and death. To determine the risk factors of severity and death occurrence, we conducted two separate backward stepwise logistic regressions (Table 4). Variables directly linked to the definition of the clinical groups were excluded (coma parameters and haemoglobin level). We have chosen not to include gene expression measures (Fig. 6), as they may differ from protein expression. Variables included in the models were first selected by univariate analysis (found significant with $P < 0.2$) (Tables 1, 2 and Figs. 2, 4 and 5). Second, the resulting variables were tested for interactions between each other by Spearman correlation or Mann Whitney U-test (Supplementary Tables S1 and S2). Table 4 shows the final results of both analyses. Finally, a lower proportion of $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ monocytes was found to be associated with severity when SMA and CM subjects were grouped together to define a "severe group" (OR 1.16, $P = 0.002$). The occurrence of death was strongly related to a lower proportion of $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ monocytes with an odds ratio of 1.9 ($P = 0.02$).

Discussion

Here, we define and quantify the monocyte subsets during acute malaria and study the main traits of monocytes associated with increased malaria severity and mortality. We show first that a lower percentage of $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ monocytes was associated with more severe malaria (considering that CM is more severe than SA) and a higher risk of death; this last association was confirmed by multivariate analysis. A key role of non-classical monocytes in the evolution of diseases has rarely been reported, unlike $CD14^{+}$ $CD16^{+}$ intermediate monocytes. Their count consistently increases in infectious and non-infectious diseases whereas $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ non-classical monocyte count is more variable, increasing in infectious diseases such as tuberculosis[30], HIV[31], and sepsis in neonates and young children[32], but decreasing in dengue fever[33] and sepsis in adult patients[34]. During non-severe *falciparum* malaria episodes, classical monocytes were predominantly reported with increased frequencies of intermediate and non-classical subpopulations[35]. In a study with SMA and CM groups, the percentage of intermediate monocytes increased in both groups when compared with the convalescent phase, but no difference was found for



c

Mono. subset	Healthy children*	UM	SMA	CM
	Median percentages (15th-75th percentile)			
Total mono. among leucocytes	7 (1) [Mean % (SD)]	6.4 (4.3 – 12.2)	11.4 (8.6 – 13.9)	10.4 (6.0 – 14.1)
Classical $CD14^{+}$ $CD16^{-}$	87.3 (84.5 -89.8)	49.4 (30.2 – 66.1)	49.5 (34.9 – 71.8)	55.7 (46.0 – 73.2)
Intermediate $CD14^{+}$ $CD16^{+}$	5.5 (3.9 - 7.8)	27.6 (19.8 – 41.0)	33.9 (18.9 – 58.7)	37.3 (18.5 – 50.7)
Non-classical $CD14^{low}$ $CD16^{+}$	6.0 (3.5 - 7.9)	11.2 (6.6 – 20.4)	4.8 (2.9 – 17.2)	2.6 (1.3 – 5.1)

* From Christensen *et al.*, reference 29

Figure 2. Percentages of CD14 CD16 monocyte subtypes according to malaria severity and death occurrence. Data shown are median percentages of $CD14^{hi}$ $CD16^{-}$, $CD14^{hi}$ $CD16^{+}$, and $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ monocytes in the different clinical groups (**a**) and according to survival or death (**b**). Detailed values are shown for healthy children (values from Christensen *et al.*, reference[29], with a mean age of 9.9 years (±2.3) (mean ± SD), n = 20) and for our subjects (**c**). Values were compared by the Mann-Whitney U-test. $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.0005$. UM: uncomplicated malaria, SMA: severe malarial anemia, CM: cerebral malaria.

non-classical monocytes[36]. This study, which took place in Kenya, and ours differ mainly in the age of the patients. Kenyan children with SMA were younger (mean 18 months) than children presenting with CM (mean 31.9 months), whereas our study participants had similar ages of around 30 months. Previous studies demonstrated the impact of age on the distribution of monocyte subsets with an increase of both intermediate and non-classical monocytes in adult patients versus newborns[37] and in young versus older adults[38]. Thus, the divergence of these results obtained in children of different ages should be interpreted with caution.

Interestingly, Dobbs *et al.* obtained results in the same direction as ours since the percentage of non-classical monocytes was lower in children with uncomplicated malaria than in healthy children of the same age[39]. In addition, a similar association was shown in patients presenting with stroke, the majority of whom had ischemic stroke, a neuro-inflammatory pathology, as is cerebral malaria[40]. The increased proportion of $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ monocytes at inclusion was associated with better outcomes. In patients presenting with systemic inflammatory response syndrome, lower non-classical monocytes was also associated to death whereas intermediate and classical monocyte counts were not related to patient survival or death[41]. Urra *et al.* suggest that the non-classical monocytes are involved in tissue repair as demonstrated for $LY6C^{low}$ monocytes in mice, a cell population similar to human $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ monocytes[40]. However, a study aiming to describe functional phenotypes of the different monocyte subsets showed that non-classical monocytes display high cytotoxic and antigen presenting abilities[42]. Furthermore, they showed that non-classical monocytes were the main producers of inflammatory cytokines (TNF and IL-1β) with a strong and stable CD16 expression. Therefore, the authors propose that non-classical monocytes are pro-inflammatory cells involved in antigen presentation[42].

In our study, a higher prevalence of non-classical monocytes was associated with lower plasma IL-6, IL-10, MCP-1, CXCL10, and lower mRNA expression of CX3CR1 and CCR2. MCP-1 and CXCL-10 are two chemokines involved in inflammatory monocytes trafficking and in Th1 response[43]. CX3CR1 (CX3CL1 receptor) and CCR2

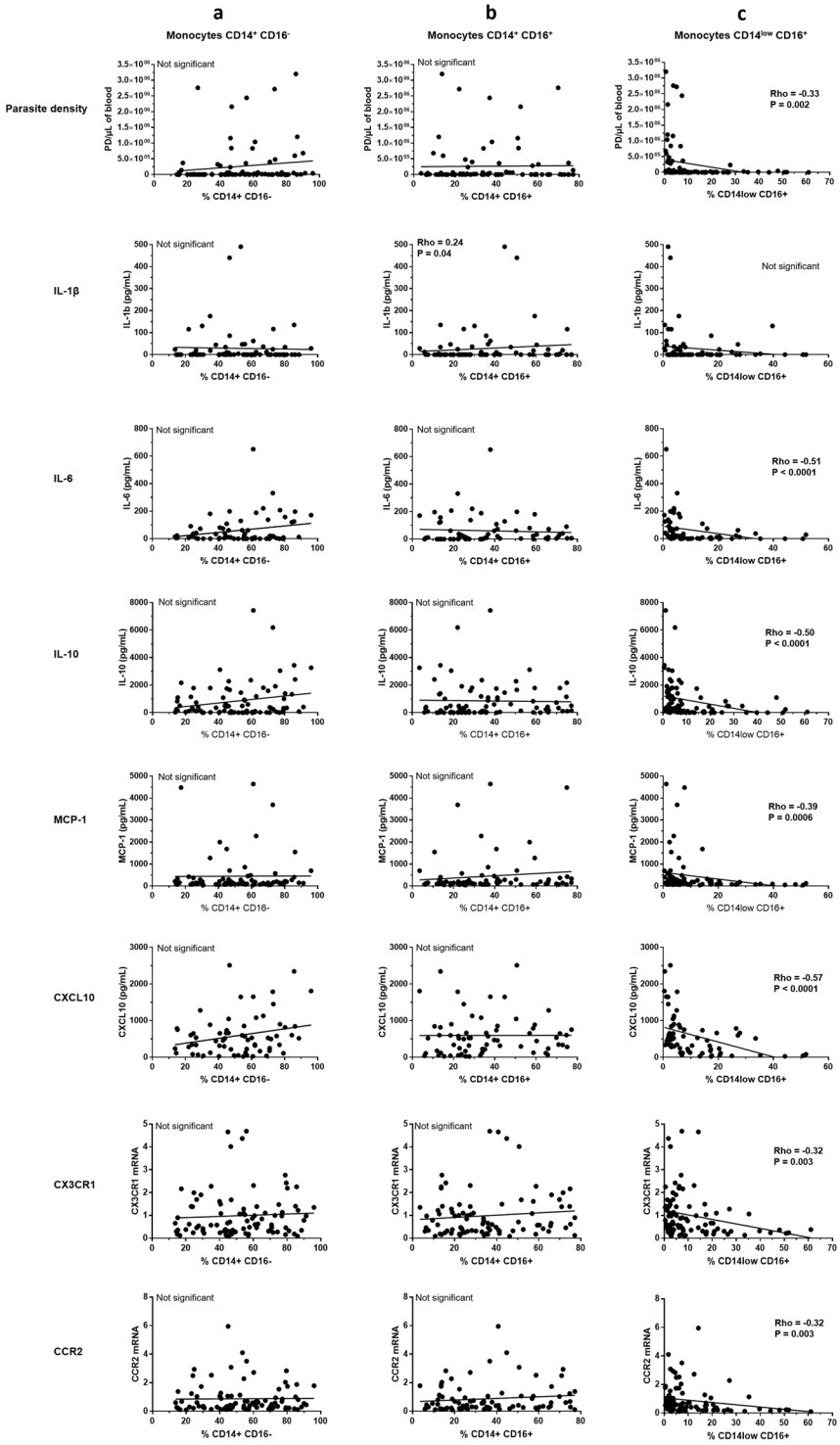


Figure 3. Correlations between prevalence of the three monocyte subtypes and parasite density, and plasma levels of cytokines and chemokines. Spearman correlation test was used.

(MCP-1 receptor) are two chemokine receptors involved in circulating monocyte recruitment to the inflammation site; CX3CL1 is also involved in monocyte attachment to the endothelium with subsequent transmigration[43]. This inverse correlation of the proportion of $CD14^{low}$ $CD16^{+}$ monocytes and CX3CR1 expression is surprising since this cell population has been reported as $CX3CR1^{high}$[22]. Such a profile appears rather anti-inflammatory despite the inverse correlation with plasma IL-10, a key anti-inflammatory cytokine. In addition, higher plasma levels of IL-1β, IL-6, IL-10, CXCL10 and mRNA levels of CCR2 and CX3CR1 were associated with severity and death outcome. This suggests that pro-inflammatory response, high plasma IL-10 and increased cell trafficking

	$CD14^+$ $CD16^-$ monocytes	$CD14^+$ $CD16^+$ monocytes	$CD14^{low}$ $CD16^+$ monocytes
CD14 MFI	11,374 (7,432–15,667)***	14,052 (11,680–17,465)$^{\$\$\$}$	2,759 (2,214–3,222)$^{\$\$\$}$
CD16 MFI	—	6,261 (4,961–10,564)$^{\$\$\$}$	7,632 (4,957–13,268)
CD36 MFI	8,630 (5,083–12,469)*	8,905 (4,952–14,938)$^{\$\$\$}$	2,954 (1,504–4,534)$^{\$\$\$}$
TLR2 MFI	389 (292–514)**	456 (369–577)$^{\$\$\$}$	324 (252–412)$^{\$\$}$

Table 3. Characterisation of monocyte subpopulations according to CD14, CD16, CD36 and TLR2 median fluorescence intensities (MFI). Values presented are medians (interquartile range). Values were compared by the Wilcoxon signed-rank test and indicated by *for $CD14^+$ $CD16^-$ versus $CD14^+$ $CD16^+$, $^{\$}$for $CD14^+$ $CD16^+$ versus $CD14^{low}$ $CD16^+$, $^{\$}$for $CD14^+$ $CD16^-$ versus $CD14^{low}$ $CD16^+$. One symbol means $P < 0.05$, two symbols $P < 0.005$ and 3 symbols $P < 0.0005$.

are markers of poor prognosis. Since non-classic monocytes were mostly inversely correlated to these parameters, these results reinforce the idea that this monocyte subset may play an important role in resolving cerebral malaria.

In our study, $CD14^{low}$ $CD16^+$ monocytes were also defined by higher CD16 expression in comparison to $CD14^+$ $CD16^+$ monocytes, which is consistent with the conclusions of Mukherjee *et al.*[42]. High CD16 expression was associated with lower severity and better survival in our patients, suggesting that the role of non-classical monocytes during cerebral malaria involves the expression of CD16. The CD16 receptor is known for its critical role in immune regulation by activating the humoral response[44], binding immune complexes leading to opsonic phagocytosis, and the release of proinflammatory cytokines that are toxic for *Plasmodium*[45]. CD16 expression may be implicated in parasite elimination, which could explain the relationship between the higher frequency of non-classical monocytes and lower parasitaemia. This monocyte subpopulation was also associated with increased vascular superoxide production in a context of vascular dysfunction[46]. A transcriptomic and proteomic study of this sub-population also showed improved aerobic respiration and ROS production capacities[47]. Such properties can also contribute to parasite elimination. However, to clarify the role of $CD14^{low}$ $CD16^+$ monocytes during malaria, additional experiments on the functionality of isolated monocyte subpopulations from patients are needed.

In our study, other parameters were also associated with severity and survival or death. Expression of CD14, CD16, CD36 and TLR2 by classical and intermediate monocytes was also related to severity and death in our study. We found that classical monocytes expressed more CD14, CD36 and less TLR2 in UM subjects in comparison to the severe groups (CM and SMA or CM alone for TLR2), and that higher expression of CD14 and CD36 by these monocytes was related to survival. The receptor CD36 is known for multiple functions such as the recognition and the elimination of apoptotic cells, a process necessary for inflammation resolution[48,49], and parasite clearance through non-opsonic phagocytosis of iE[24,26], which propels CD36 as a therapeutic target[27,50]. Berry *et al.* showed decreased expression of CD36 in UM patients compared with healthy subjects, and with patients who had recovered from malaria[51]. These findings were confirmed in a later study since CD36 was less expressed by classical monocytes in acute malaria patients compared to recovery and healthy subjects[39]. Our data refine these results by specifying that lower CD36 expression by both classical and intermediate monocytes is related to severity and death.

Beyond their own functions, monocytes are also key cells for the interaction and activation of T lymphocytes and humoral response via the expression of HLA and costimulatory receptors such as HLA-DR and CD86. HLA-DR is a MHC class II receptor critical for peptide presentation to CD4 T cells, while CD86 provides costimulation to T cells for activation and proliferation. They were both shown to be downregulated in SMA and CM patients compared to uninfected children and attributed to an immunosuppressive effect[52]. In our study, HLA-DR expression was lower in CM patients compared to SMA and UM and this downregulation was related to death, while CD86 expression was not clearly associated with severity or death. This result, which can be compared with that of CD16, underlines the importance of the monocyte-stimulated T response in the resolution of cerebral malaria.

In conclusion, our data provide, to the best of our knowledge, the first evidence that non-classical $CD14^{low}$ $CD16^+$ monocytes are necessary to limit death occurrence in SMA and CM forms, a result confirmed by multivariate analysis. Thus, a small proportion of non-classical monocytes may constitute a marker of poor prognosis in cerebral malaria. Further studies are needed to decipher the functions of this sub-population and understand the mechanisms involved.

Materials and Methods

Study site. Patients were enrolled in Cotonou (6° 21′35″ North, 2° 26′23″ East) and Sô Tchanhoué (2°24′58″ East, 6°28′09″ North). Sô-Tchanhoué is a village located in Nokoué Lake, a permanent natural lake in the southeast of Benin, 20 km north of Cotonou. In southern Benin, malaria is mesoendemic and transmission is perennial[53]. Severe malaria mainly occurs during the rainy season (April to mid-July).

Patients and ethics statement. Ethical clearance was obtained from the Institutional Ethics Committee of the Institut des Sciences Biomédicales Appliquées in Cotonou, Benin. All study procedures were performed in accordance with the institutional policies, guidelines and regulations pertaining to research involving human subjects. Children under 5 years old were enrolled during the rainy season (May to July) in 2014 and 2016 after signed informed consent was obtained from the parents.

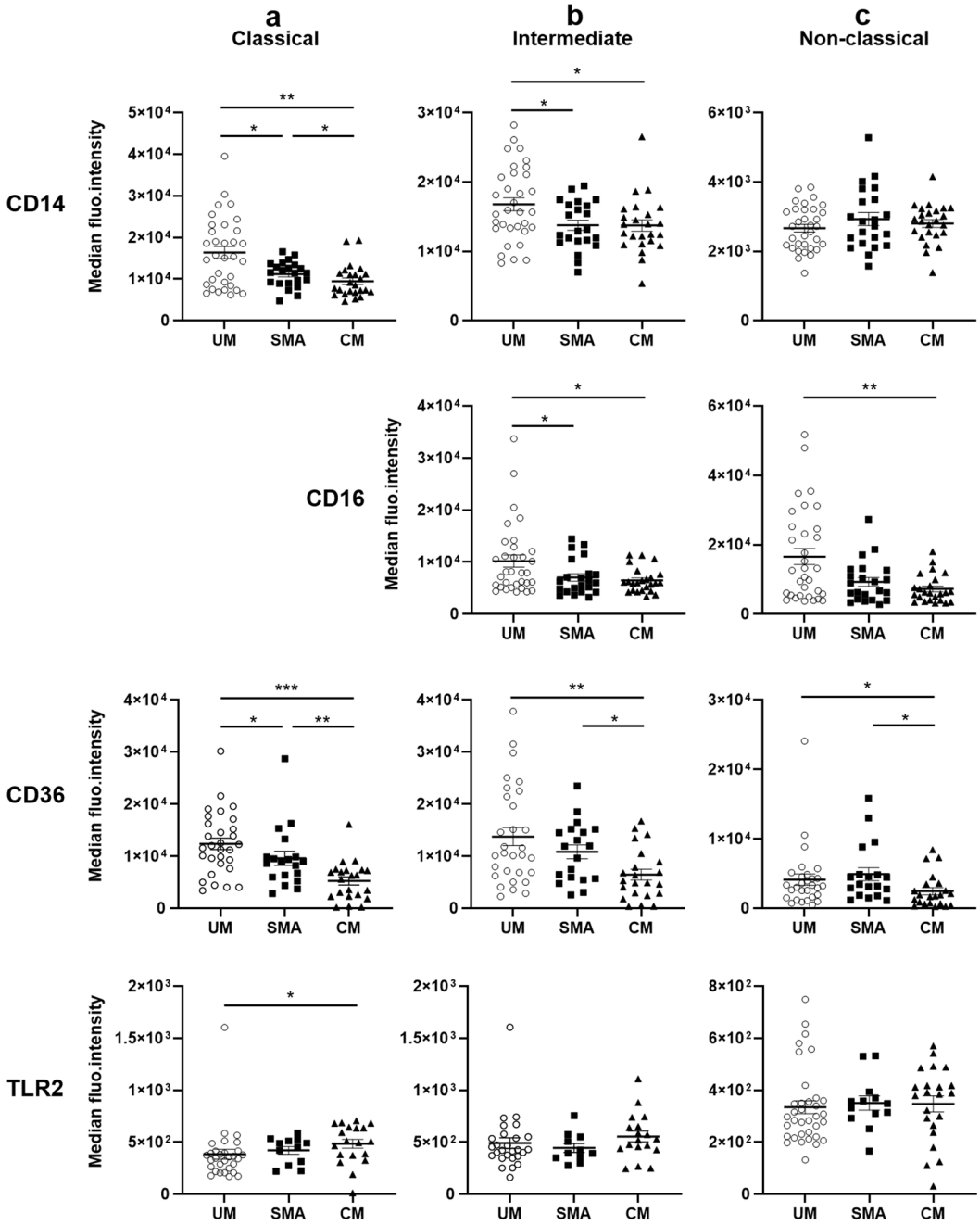


Figure 4. Differential protein expression of surface receptors on monocyte subsets according to severity. Data shown are median fluorescence intensities of CD14, CD16, CD36 and TLR2. (**a**) Expressed by classical monocytes (without CD16 which is not expressed in this subset), (**b**) by intermediate monocytes, (**c**) by non-classical monocytes. Values were compared by the Mann-Whitney U-test. $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.0005$. UM: uncomplicated malaria, SMA: severe malarial anemia, CM: cerebral malaria.

Severe cases (SMA and CM) were recruited from the Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, a referral hospital for severe malaria. Patients were managed by the medical team of each health facility. Uncomplicated cases (UM) were recruited in the medical centre of Saint-Joseph in Sô Tchanhoué. Each child was clinically examined at admission. A rapid diagnostic test for *P. falciparum* (Malaria antigen P.f test, SD Bioline) and for HIV (Alere Determine HIV-1/2, Abbott) was performed, and a venous blood sample was collected for parasitaemia measurement by thick blood smear and for isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Children who tested negative for *P. falciparum* and positive for HIV infection were excluded from the study. After blood sampling, an adequate antimalarial treatment was administered according to the national policy (oral artemether-lumefantrine combination for UM, intravenous quinine or artesunate for CM and SMA).

As proposed by the World Health Organization (WHO)[54], SMA cases were defined as children with asexual *P. falciparum* parasitaemia, a haemoglobin (Hb) level ≤ 5 g/dl and absence of neurological signs. Cerebral malaria

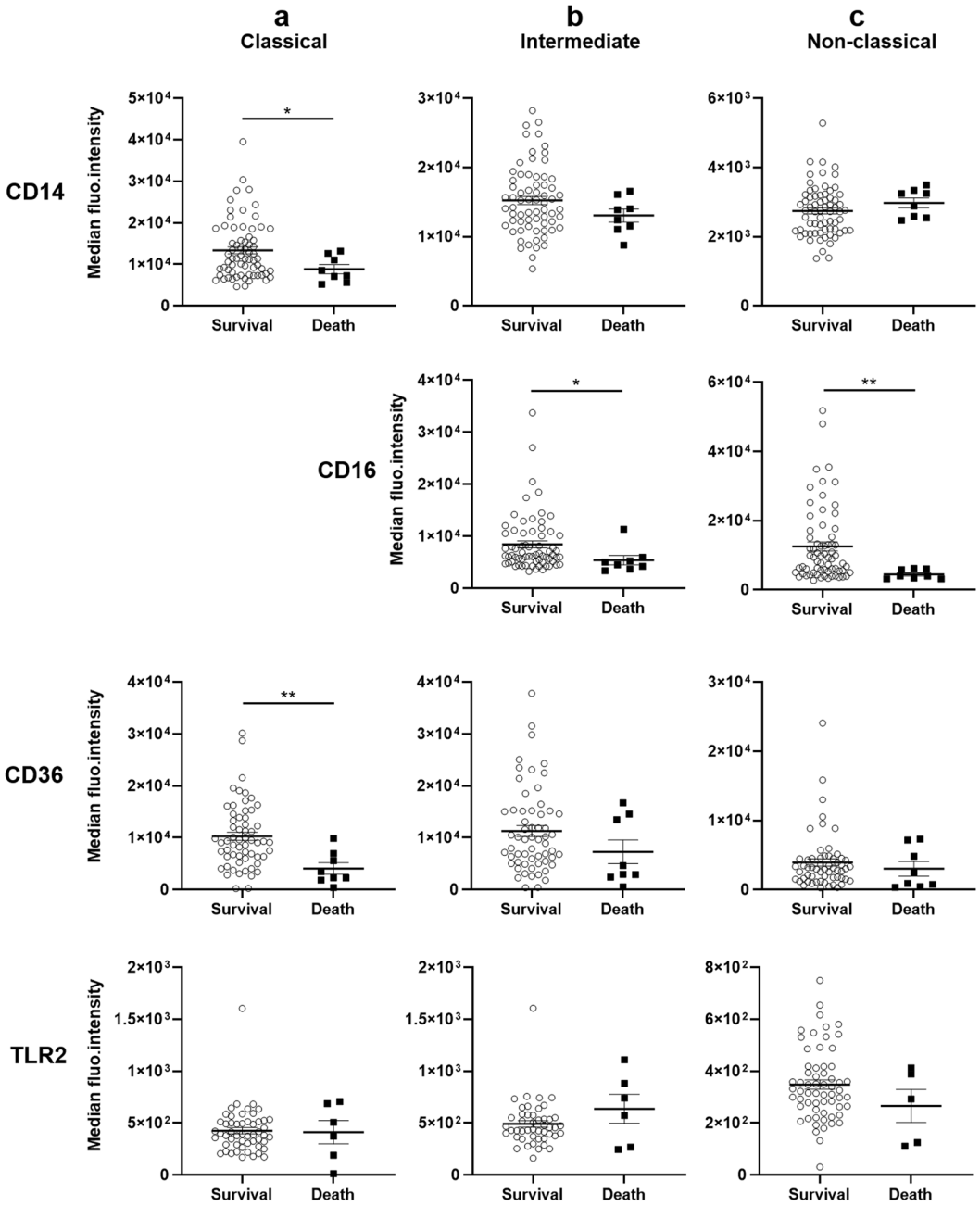


Figure 5. Differential protein expression of surface receptors on monocyte subsets according to survival or death. Data shown are median fluorescence intensities of CD14, CD16, CD36 and TLR2. (**a**) Expressed by classical monocytes (without CD16 which is not expressed in this subset), (**b**) by intermediate monocytes, (**c**) by non-classical monocytes. Values were compared by the Mann-Whitney U-test. $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.0005$.

was defined as asexual *P. falciparum* parasitaemia and a Blantyre coma score ≤ 2 combined with a coma duration of six hours at least, with exclusion of other causes for coma[54], particularly trauma and meningitis controlled by lumbar puncture when indicated. Children presenting UM had a positive diagnosis for *P. falciparum* infection combined with fever >37 °C and no sign of severity. A questionnaire was completed with the parents in order to collect social data and clinical signs and treatment received before hospital admission.

Blood collection and processing. A biological assessment was carried out by the medical team at admission including haemoglobin, glycemia and blood group. For research purposes, a minimum of 4 mL peripheral venous blood was collected at admission from all patients in a vacutainer tube containing EDTA, and processed within 4 hrs. Giemsa-stained thick blood smears were prepared from venous blood collected in EDTA tubes to quantify the parasite load. Plasma was sampled after centrifugation and preserved at −80 °C. Human PBMC

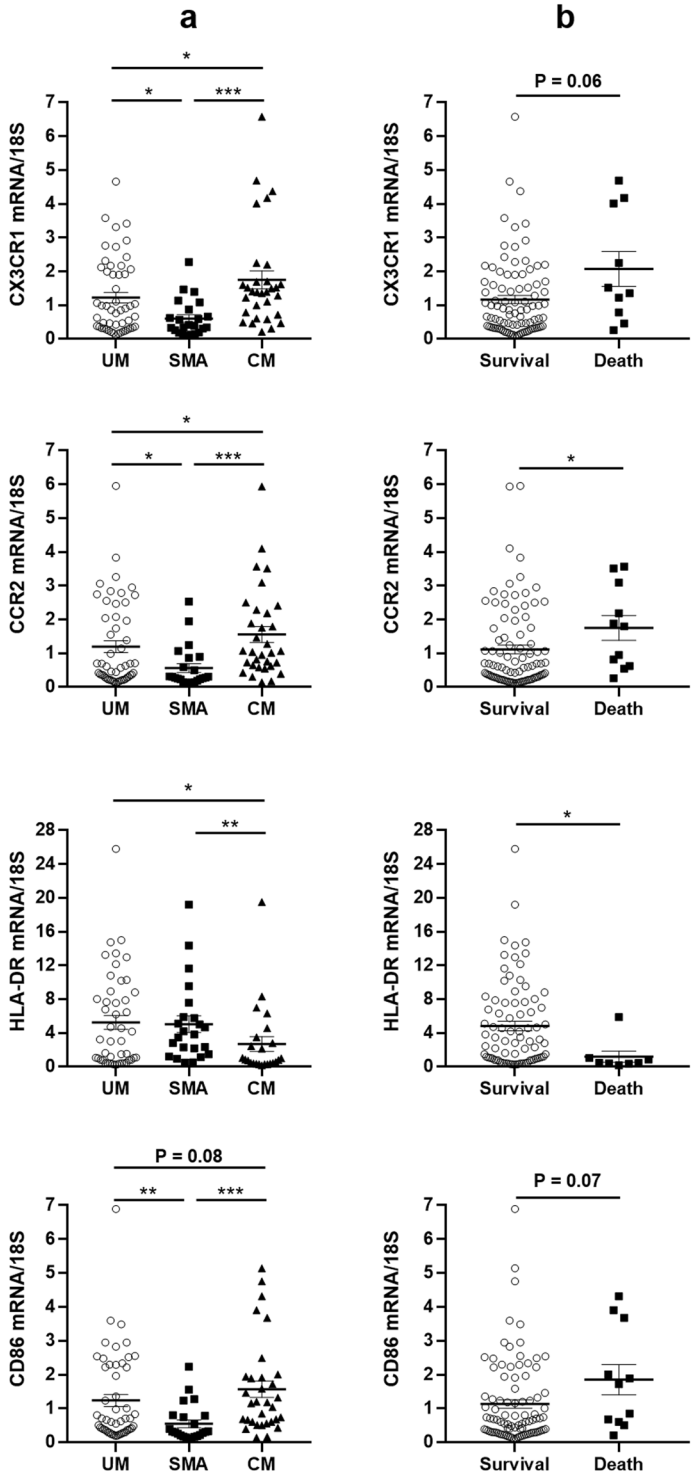


Figure 6. Differential gene expression of surface receptors on monocyte subsets according to severity (**a**) and fatal outcome (**b**). Values were compared by the Mann-Whitney U-test. $*P < 0.05$, $**P < 0.005$, $***P < 0.0005$. UM: uncomplicated malaria, SMA: severe malarial anemia, CM: cerebral malaria.

	SMA vs CM or UM			UM vs SMA or CM			Death vs Survival		
	OR*	95% CI*	*P*	OR	95% CI	*P*	OR	95% CI	*P*
$CD14^{low}$ $CD16^{+}$ %	0.079	0.99–1.20	0.09	**1.16**	**1.06–1.30**	**0.002**	**1.9**	**1.11–3.13**	**0.019**

Table 4. Results of the backward stepwise multinomial logistic regression analysis for the determination of risk factors of malaria severity and death. *OR: odds ratio; CI: confidence interval.

were isolated by a density gradient centrifugation method on Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway). Cells were frozen in RPMI supplemented with 30% foetal bovine serum and 30% DMSO in liquid nitrogen until cytometry experiments.

IL-1β, IL-6, IL-10, MCP-1 and CXCL10 plasma titration. The levels of IL-1β, IL-10, and MCP-1 in plasma samples were determined using commercially available OptiEIA kits (BD Biosciences, France). IL-6 and CXCL10 plasma levels were tested using R & D Systems DuoSet (Bio-Techne, France). As suggested by the manufacturer's instructions, we established the lower limits of detection (LLDs) for the five parameters tested, as follows: (mean negative control optical density) +2 * (Standard deviation of negative control optical density). Our LLDs were 14.7, 4.8, 22.2, 30.4 and 31.3 pg/ml for IL-1β, IL-6, IL-10, MCP-1 and CXCL10 respectively.

Analysis of monocyte subpopulations by flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells were stained with fluorochrome labelled antibodies: anti-CD14 peridinin chlorophyll protein combined to Vio 700 Dye (PerCPVio700), anti-CD16 phycoerythrin (PE), anti-CD36 fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-TLR2 allophycocyanin (APC) (all from Miltenyi Biotec, France), and live-dead-violet (Life Technologies, France) to exclude dead cells. For each sample, all cells were analysed in order to maximize the number of cells of interest. So, a minimum of 30,000 total events were acquired for each sample (median number of events acquired 166,126, 25th percentile 113,351, 75th percentile 233,360) resulting in a minimum of 1000 live cells of interest analysed for each sample. Acquisitions were performed on a cytometer Fortessa (BD Biosciences, France). Forward and side scattering parameters (FSC and SSC) were first used to gate on monocytes among other leucocytes. Three CD14 CD16 monocytes subsets were defined according to anti-CD14 and anti-CD16 labelling (see Fig. 1). Data analysis was carried out on DIVA software. Data are presented as the percentage of positive cells from the total gated monocytes, or as the median fluorescence intensity (MFI) of the receptor studied in the population gated.

Monocyte isolation and mRNA expression measurements by RT-qPCR. Monocytes were isolated, RNA was extracted and CX3CR1, CCR2, HLA-DR and CD86 genes were amplified by qPCR as described before[23]. The primers used were designed using Primer 3 software, as follows: CX3CR1 sense 5′ ATA-TCC-CCT-CCC-AGT-CAC-CT, antisense 5′ GGT-CTG-GAC-GGG-TGA-ATA-CA; CCR2 sense 5′ TGG-CTG-TGT-TTG-CTT-CTG-TC, antisense 5′ CCC-GAG-TAG-CAG-ATG-ACC-AT; HLA-DR sense 5′ AGG-CAG-CAT-TGA-AGT-CAG-GT, antisense 5′ CTC-AGC-ATC-TTG-CTC-TGT-GC; CD86 sense 5′ ACA-GAT-GTC-CTA-CGG-GAA-CG, antisense 5′ ATC-CCA-CCT-TAG-AGC-CAG-GT; Housekeeping gene 18S sense 5′ AAA-CGG-CTA-CCA-CAT-CCA-AG, antisense 5′ CCT-CCA-ATG-GAT-CCT-CGT-TA.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed on Statview software (Abacus Concepts Berkeley, CA) and Prism software (version 8.1.0). Non parametric tests were used for all analyses. Mann-Whitney U-test was used to compare continuous values between the different clinical groups (UM, SMA, CM), after validation of significant differences between the three groups by the Kruskall-Wallis test. To study quantitative variables, the Spearman's rank correlation test was used to assess correlations and the Wilcoxon signed-rank test to compare values. To determine the most significant parameters regarding severity and death occurrence, two multivariate analyses were then performed by logistic regression. Only variables that were found to be significant by univariate analysis with $P < 0.2$, that were not directly related to the definition of the clinical groups (i.e. seizure, Blantyre score, haemoglobin), and variables found to be independent of each other, were tested by backward stepwise logistic regression (see Supplementary Tables S1 and S2). P values < 0.05 were considered statistically significant.

Received: 24 April 2019; Accepted: 18 October 2019;
Published online: 26 November 2019

References

1. Christensen, S. S. & Eslick, G. D. Cerebral malaria as a risk factor for the development of epilepsy and other long-term neurological conditions: a meta-analysis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **109**, 233–238 (2015).
2. Dondorp, A. M. *et al*. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* **376**, 1647–1657 (2010).
3. Oluwayemi, I. O., Brown, B. J., Oyedeji, O. A. & Oluwayemi, M. A. Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria. *Pan Afr. Med. J.* **15**, 88 (2013).
4. Brand, N. R., Opoka, R. O., Hamre, K. E. S. & John, C. C. Differing Causes of Lactic Acidosis and Deep Breathing in Cerebral Malaria and Severe Malarial Anemia May Explain Differences in Acidosis-Related Mortality. *PloS One* **11**, e0163728 (2016).
5. Elphinstone, R. E. *et al*. Dysregulation of the haem-haemopexin axis is associated with severe malaria in a case-control study of Ugandan children. *Malar. J.* **14**, 511 (2015).
6. White, N. J., Turner, G. D. H., Day, N. P. J. & Dondorp, A. M. Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *J. Infect. Dis.* **208**, 192–198 (2013).
7. Idro, R., Jenkins, N. E. & Newton, C. R. J. C. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol.* **4**, 827–840 (2005).
8. Taylor, T. E. *et al*. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat. Med.* **10**, 143–145 (2004).
9. Becker, K. *et al*. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int. J. Parasitol.* **34**, 163–189 (2004).
10. Weinberg, J. B. *et al*. Monocyte polarization in children with falciparum malaria: relationship to nitric oxide insufficiency and disease severity. *Sci. Rep.* **6**, 29151 (2016).
11. Dondorp, A. M. *et al*. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* **60**, 733–737 (1999).
12. Dondorp, A. M. *et al*. Red cell deformability, splenic function and anaemia in thalassaemia. *Br J Haematol* **105**, 505–508 (1999).
13. Price, R. *et al*. Factors contributing to anemia after uncomplicated falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg*, **65**, 614–622
14. Abdalla, S., Weatherall, D. J., Wickramasinghe, S. N. & Hughes, M. The anaemia of P. falciparum malaria. *Br. J. Haematol.* **46**, 171–183 (1980).

15. Helleberg, M. *et al*. Bone marrow suppression and severe anaemia associated with persistent Plasmodium falciparum infection in African children with microscopically undetectable parasitaemia. *Malar J* **4**, 56 (2005).
16. Phillips, R. E. *et al*. The importance of anaemia in cerebral and uncomplicated falciparum malaria: role of complications, dyserythropoiesis and iron sequestration. *Q. J. Med.* **58**, 305–323 (1986).
17. Awandare, G. A. *et al*. Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia. *Infect. Immun.* **75**, 201–210 (2007).
18. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527–2534 (1989).
19. Fingerle, G. *et al*. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* **82**, 3170–3176 (1993).
20. Nockher, W. A. & Scherberich, J. E. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect. Immun.* **66**, 2782–2790 (1998).
21. Ziegler-Heitbrock, L. *et al*. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74–80 (2010).
22. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. & Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* **2**, 1 (2014).
23. Aubouy, A. *et al*. Nrf2-driven CD36 and HO-1 gene expression in circulating monocytes correlates with favourable clinical outcome in pregnancy-associated malaria. *Malar. J.* **14** (2015).
24. McGilvray, I. D., Serghides, L., Kapus, A., Rotstein, O. D. & Kain, K. C. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood* **96**, 3231–3240 (2000).
25. Serghides, L. & Kain, K. C. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-retinoid X receptor agonists increase CD36-dependent phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF-alpha secretion by monocytes/macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 6742–6748 (2001).
26. Patel, S. N. *et al*. Disruption of CD36 impairs cytokine response to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositol and confers susceptibility to severe and fatal malaria *in vivo*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 3954–3961 (2007).
27. Olagnier, D. *et al*. Nrf2, a PPARγ alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. *PLoS Pathog.* **7**, e1002254 (2011).
28. Gowda, D. C. TLR-mediated cell signaling by malaria GPIs. *Trends Parasitol.* **23**, 596–604 (2007).
29. Christensen, J. J. *et al.* Altered leukocyte distribution under hypercholesterolemia: A cross-sectional study in children with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* **256**, 67–74 (2017).
30. Castaño, D., García, L. F. & Rojas, M. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberc. Edinb. Scotl.* **91**, 348–360 (2011).
31. Tippett, E. *et al*. Differential expression of CD163 on monocyte subsets in healthy and HIV-1 infected individuals. *PloS One* **6**, e19968 (2011).
32. Skrzeczyńska, J., Kobylarz, K., Hartwich, Z., Zembala, M. & Pryjma, J. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand. J. Immunol.* **55**, 629–638 (2002).
33. Azeredo, E. L. *et al*. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology* **130**, 202–216 (2010).
34. Poehlmann, H., Schefold, J. C., Zuckermann-Becker, H., Volk, H.-D. & Meisel, C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit. Care Lond. Engl.* **13**, R119 (2009).
35. Chimma, P. *et al*. A distinct peripheral blood monocyte phenotype is associated with parasite inhibitory activity in acute uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *PLoS Pathog.* **5**, e1000631 (2009).
36. Ogonda, L. A. *et al*. The levels of CD16/Fc gamma receptor IIIA on CD14+ CD16+ monocytes are higher in children with severe Plasmodium falciparum anemia than in children with cerebral or uncomplicated malaria. *Infect. Immun.* **78**, 2173–2181 (2010).
37. Pedraza-Sánchez, S., Hise, A. G., Ramachandra, L., Arechavaleta-Velasco, F. & King, C. L. Reduced frequency of a CD14+ CD16+ monocyte subset with high Toll-like receptor 4 expression in cord blood compared to adult blood contributes to lipopolysaccharide hyporesponsiveness in newborns. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* **20**, 962–971 (2013).
38. Seidler, S., Zimmermann, H. W., Bartneck, M., Trautwein, C. & Tacke, F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol.* **11**, 30 (2010).
39. Dobbs, K. R. *et al*. Monocyte dysregulation and systemic inflammation during pediatric falciparum malaria. *JCI Insight* **2** (2017).
40. Urra, X. *et al*. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **29**, 994–1002 (2009).
41. Krychtiuk, K. A. *et al*. Monocyte subset distribution is associated with mortality in critically ill patients. *Thromb. Haemost.* **116**, 949–957 (2016).
42. Mukherjee, R. *et al*. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematous. *Sci. Rep.* **5**, 13886 (2015).
43. Griffith, J. W., Sokol, C. L. & Luster, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 659–702 (2014).
44. Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A. & Schmidt, R. E. The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.* **76**, 231–248 (1998).
45. Ravetch, J. V. & Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275–290 (2001).
46. Urbanski, K. *et al*. CD14+CD16++ 'nonclassical' monocytes are associated with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Thromb. Haemost.* **117**, 971–980 (2017).
47. Zhao, C. *et al*. The CD14+/lowCD16+ monocyte subset is more susceptible to spontaneous and oxidant-induced apoptosis than the CD14+CD16− subset. *Cell Death Dis.* **1**, e95 (2010).
48. Savill, J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **61**, 375–380 (1997).
49. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197 (2005).
50. Serghides, L. *et al*. PPARγ agonists improve survival and neurocognitive outcomes in experimental cerebral malaria and induce neuroprotective pathways in human malaria. *PLoS Pathog.* **10**, e1003980 (2014).
51. Berry, A. *et al*. *Ex vivo* and *in vitro* impairment of CD36 expression and tumor necrosis factor-alpha production in human monocytes in response to Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes. *J. Parasitol.* **91**, 316–322 (2005).
52. Mandala, W. L. *et al*. Monocyte activation and cytokine production in Malawian children presenting with P. falciparum malaria. *Parasite Immunol.* **38**, 317–325 (2016).
53. Damien, G. B. *et al*. Malaria infection and disease in an area with pyrethroid-resistant vectors in southern Benin. *Malar. J.* **9**, 380 (2010).
54. WHO. Management of severe malaria: a practical handbook - 3rd ed. (2012).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the study participants and their parents. We thank the staff of the paediatric wards at the CHUMEL hospital in Cotonou and at Saint Joseph medical centre in Sô-Tchanhoué, Benin, for their help. We thank Alexia Zakaroff-Girard, Elodie Riant and Christiane Pecher from the cytometry technical platform (Rangueil Hospital, Toulouse) for their kind help for cytometry analysis. We thank Dr Judith Fillaux and Dr Michel Cot for their help with the multivariate analysis. Agence Nationale de la Recherche (ANR) provided

funding to Jade Royo under grant number ANR-17-CE17-0001-03. This work was partly funded by Merieux Research Grant (awarded to Dr Gwladys Bertin for CIVIC project).

Author contributions

A.A., B.P., A.C., H.A., D.O., P.D. and G.B. designed the study. A.M., J.A. and Y.L. helped in the design of the study groups, ascertained diagnoses and obtained samples. J.R., M.R., C.K. and S.E. performed the experiments. J.R., B.P. and A.A. analysed the data and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-52579-7.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.A.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

II – Rôle et caractérisation des sous-populations monocytaires au cours du neuropaludisme dans un modèle murin de résolution

II-1. Introduction

Aucun modèle expérimental de paludisme *in vitro* et *in vivo* ne peut reproduire réellement l'ensemble des caractéristiques physiopathologiques et la complexité de la réponse immunitaire observée lors d'une infection palustre (470, 475). Les souches murines de *Plasmodium* (*P. chabaudi*, *berghei*, *yoelii*, *vinckei*) sont cependant très utiles pour comprendre la pathogénèse de la maladie, les mécanismes immunitaires et les gènes mis en jeu pour lutter contre l'infection, ainsi que dans la recherche de nouvelles pistes de traitements. En fonction de la souche utilisée et du fond génétique de la souris, l'infection palustre peut présenter différentes physiopathologies (150, 476). Par exemple, la souche *P. chabaudi chabaudi* induit chez la souris un paludisme non létal conduisant à une résolution spontanée de l'infection en une à deux semaines. Les modèles expérimentaux de paludisme cérébral (ECM) ont également été développés en utilisant principalement *P. berghei ANKA* mais également *P. berghei K173* et *P. yoelii XL*. Ces deux derniers présentent cependant de grandes différences avec un neuropaludisme humain avec respectivement des signes cliniques variables en fonction de la charge parasitaire administrée et le développement d'une hyperparasitémie (477). L'infection à *P. berghei ANKA* reste le modèle de choix pour l'étude du neuropaludisme chez la souris (470, 475, 476, 478, 479) bien que la physiopathologie de l'infection reste là aussi dépendante du fond génétique des souris. Si les souris CBA ou C57BL/6 développent un paludisme cérébral létal, il est non létal chez les souris DBA/2. Les souris BALB/c vont quant à elles présenter une hyperparasitémie sans symptôme neurologique (150, 476).

Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai donc utilisé des souris C57BL/6 infectées par la souche *P. berghei ANKA*, modèle d'ECM partageant de nombreuses similarités avec un neuropaludisme induit par *P. falciparum* chez l'homme, notamment en termes d'histopathologie et de réponses inflammatoires (150, 470, 475, 477). Les études *in vivo* effectuées sur la souris semblent en adéquation avec les données cliniques observées chez les

patients. En effet, tout comme chez l'homme, les souris infectées développent des signes neurologiques caractéristiques (paralysie, convulsions, coma puis décès) observés dès J5 post-infection. Ces derniers sont corrélés au développement d'une forte réponse pro-inflammatoire, *via* notamment la production de cytokines (476–478). De même, la sensibilité à l'infection palustre semble dépendante de l'âge des souris : des souris jeunes seront plus susceptibles de développer un ECM que des souris âgées (480). En revanche, certaines études semblent montrer que le neuropaludisme chez l'homme est principalement dû à la séquestration des GRi dans les micro-vaisseaux cérébraux, alors que chez la souris il serait déterminé par l'accumulation de cellules immunitaires (LT, monocytes, neutrophiles, cellules NK et plaquettes) dans le cerveau (124, 125, 475, 481–483). L'accumulation des GRi dans le cerveau des souris a également été rapportée dans certaine études mais son implication dans le développement d'un ECM est encore discutée. En effet, si des travaux indiquent que la séquestration des GRi dans les micro-vaisseaux cérébraux ne semble pas nécessaire à l'établissement d'un ECM (286), d'autres montrent qu'elle est indispensable à sa mise en place (479, 484). Le recrutement des cellules immunitaires au cerveau a également été observé chez l'homme mais dans une moindre mesure (396). Chez la souris, le rôle des monocytes dans la physiopathologie du neuropaludisme reste encore flou. Il semblerait que ces cellules ne soient pas directement impliquées dans le développement d'un ECM et joueraient un rôle mineur dans le recrutement des lymphocytes au cerveau (233, 481, 482). En revanche l'accumulation des LT et principalement des LT CD8 cytotoxiques a été largement décrite dans le cerveau des souris infectées et est associée à l'altération de la BHE et au décès des souris (124, 125, 330, 481, 485). Très récemment, ce phénomène a aussi été observé dans le cerveau de patients atteints de neuropaludisme (464, 486).

Finalement, ces études indiquent que le modèle d'ECM caractérisé par l'infection de souris C57BL/6 par la souche *P. berghei ANKA* présente de fortes similarités avec le neuropaludisme humain. Il est donc actuellement le meilleur modèle d'étude des mécanismes physiopathologiques mis en place lors d'un neuropaludisme. J'ai donc choisi ce modèle afin d'étudier la cinétique de la répartition et de l'état d'activation des sous-populations monocytaires au cours d'un paludisme cérébral (J0-J3-J5-J7). De plus, il me permet d'étudier les phénomènes mis en place dans la circulation périphérique mais également dans les organes profonds difficilement accessibles chez l'homme tels que le cerveau ou la rate, organes essentiels dans la pathologie palustre. Zak *et al* ont ainsi émis l'hypothèse selon laquelle les réponses immunitaires observées dans le sang périphérique pourraient ne pas refléter ce qui se passe localement dans les organes profonds (487). Afin d'étudier l'évolution des populations

monocytaires lors de la résolution de l'infection palustre, j'ai mis en place un modèle résolutif de neuroinflammation en traitant les souris avec de la chloroquine (CQ) de façon tardive lors de l'apparition des symptômes neurologiques (J6-J7-J8-J9). La CQ possède de nombreuses propriétés immunomodulatrices dont les principales sont : 1/ l'inhibition de l'acidification lysosomale conduisant au blocage de l'autophagie (488, 489), 2/ l'inhibition des fonctions chimiotactiques et phagocytaires des monocytes/macrophages (490, 491), 3/ l'altération des mécanismes de présentation antigénique aux LT (492, 493), 4/ la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, IL-12, TNFα, IFNγ) et l'augmentation de la sécrétion d'IL-10 anti-inflammatoire par les PBMC (488, 493–496), 5/ l'inhibition de la phospholipase A2 (PLA2) conduisant au blocage de la production de prostaglandines en particulier de la PGE2 pro-inflammatoire (488), et enfin 6/ l'augmentation de la production de ROS intracellulaire par les macrophages (488, 497). Ces effets seront pris en compte dans l'interprétation de nos résultats.

Les objectifs de cette étude sont multiples : 1/ étudier la cinétique de la répartition et de l'état d'activation des populations monocytaires au cours d'un paludisme cérébral et de sa résolution dans le sang, le cerveau et la rate des souris, 2/ déterminer si les résultats observés dans la circulation périphérique reflètent les phénomènes mis en œuvre dans les organes profonds (cerveau et rate), 3/ comparer les réponses immunitaires observées dans ce modèle et lors d'un neuropaludisme chez l'homme afin de déterminer si une extrapolation des résultats est possible et pertinente.

II-2. Matériels et méthodes

Souris

Des souris C57BL/6 âgées de 6 semaines et pesant entre 19 et 22 grammes ont été achetées au laboratoire Janvier puis gardées une semaine dans notre animalerie afin de les laisser s'acclimater. Dès leur arrivée et au cours des expérimentations, les souris ont été maintenues dans des conditions de laboratoire standards, dans un environnement calme et contrôlé (libre accès à l'eau et la nourriture, enrichissement adapté, température et luminosité contrôlées). Toutes les expérimentations animales ont été effectuées dans le respect du bien-être animal et approuvées par par le comité d'éthique institutionnel (CEEA122) avec le numéro de permis 5275-201604-1515469392 conformément aux lignes directrices légales et institutionnelles européennes (2010/63/UE) pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire.

Infection des souris par *P. berghei ANKA* et traitement tardif par la chloroquine (CQ)

Les parasites *P. berghei ANKA* stockés dans de l'azote liquide ont été décongelés et dilués dans du NaCl 0,9% stérile avant d'être inoculés aux souris par voie intra-péritonéale (1.10^6 parasites dans 200µl de NaCl 0,9% par souris et par injection). Sept groupes de souris ont été déterminés en fonction de la cinétique de l'infection et sacrifiés à différents temps post-infection (p-i) : J0, J3, J5, J7 (souris non traitées et traitées), J8 (traitées) et J12 (traitées) (Figure 17). En fonction des groupes, les souris ont été traitées tardivement à la CQ dès l'apparition des symptômes neurologiques à J6-J7-J8-J9 p-i (injection intrapéritonéale de 25mg/kg de CQ par jour et par souris dans 400µl de NaCl 0,9% stérile). Un suivi clinique (poids, comportement) et parasitaire a été effectué quotidiennement. Afin d'évaluer l'atteinte cérébrale, un score neurologique a été déterminé quotidiennement selon la méthodologie décrite par Carroll *et al* (498). Ce dernier, appelé « rapid murine cerebral behaviour scale » (RMCBS), consiste à évaluer 10 paramètres (démarche, équilibre, comportement exploratoire, toilette, position du corps, réflexe d'évasion tactile, réflexe du pavillon de l'oreille, force des membres, réflexe des orteils, comportement agressif) et à donner, pour chacun d'eux, des scores allant de 0 à 2. Plus le score est faible, plus l'atteinte neurologique est forte. Les souris ont été sacrifiées par inhalation de CO_2 et le sang périphérique, la rate et le cerveau ont été immédiatement prélevés. Les souris non traitées ont toutes été sacrifiées à J7 ou J8 p-i au regard de leurs symptômes neurologiques avancés.

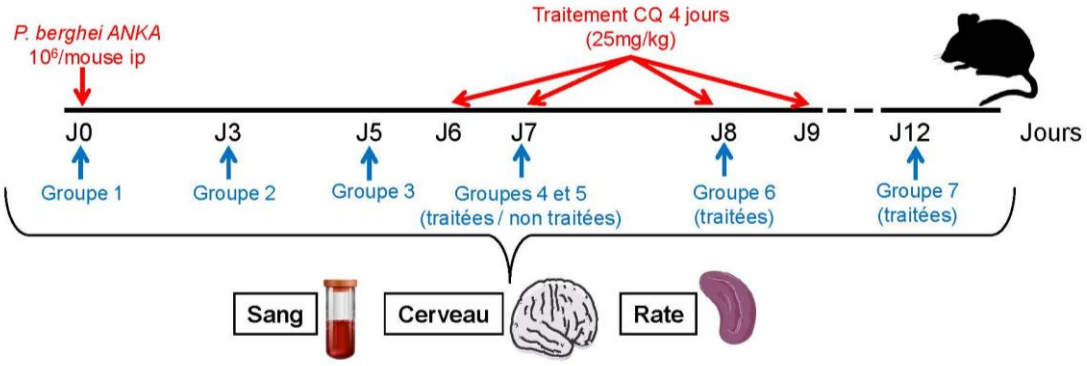


Figure 17 : Modèle d'étude de la cinétique du paludisme cérébral murin et de sa résolution par un traitement tardif des souris à la CQ

Prélèvement du sang périphérique, du cerveau et de la rate des souris

Le sang périphérique de souris a été récupéré dans des tubes héparinés puis centrifugé (1500 rpm, 5min) afin de séparer le plasma du sang total. Le plasma a été congelé et gardé à -80°C pour mesurer ultérieurement les concentrations de cytokines. Les PBMC ont été séparées du

culot globulaire par centrifugation en gradient de densité (Lymphoprep, Stemcell Technologies) puis lavées deux fois au DPBS$^{-/-}$ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without calcium chloride and magnesium chloride, Sigma) avant d'être repris dans 1mL de DPBS$^{-/-}$. Les cerveaux des souris ont été prélevés, lavés au DPBS$^{-/-}$ puis broyés dans 7mL de DPBS$^{-/-}$ avant d'être filtrés (filtre 100µm). Une partie de ce broyat filtré a été traité par de l'IGEPAL (Sigma) et congelé en vue de l'analyse ultérieure des concentrations de cytokines présentes dans les cerveaux totaux des souris. Le reste du broyat cérébral a été centrifugé une première fois pour éliminer le surnageant (1500 rpm, 10min) puis le culot cellulaire a été une nouvelle centrifugé en gradient de densité (800g, 20min, décélération à zéro, Percoll®, Sigma). L'anneau de PBMC a ensuite été récupéré puis lavé deux fois au DPBS$^{-/-}$ avant d'être repris dans 1mL de DPBS$^{-/-}$. Les rates des souris ont été prélevées, broyées dans 7mL de DPBS$^{-/-}$ puis filtrées (filtre 40µm) avant d'être centrifugées (1500 rpm, 10min). Les GR présents dans le culot cellulaire ont été lysés par l'ajout de 1mL de tampon ACK (Ammonium Chloride Potassium) puis à nouveau centrifugés (1500 rpm, 10min). Le culot cellulaire a ensuite été resuspendu dans 1mL de DPBS$^{-/-}$.

<u>Caractérisation des sous-populations monocytaires et de la microglie par cytométrie en flux et tri cellulaire</u>

La cytométrie en flux a permis une analyse phénotypique des sous-populations monocytaires issues des PBMC du sang périphérique, du cerveau et de la rate des souris en fonction de la cinétique de l'infection palustre et de sa résolution (J0, J3, J5, J7 non traitées et traitées, J8 traitées, J12 traitées). En parallèle, un tri cellulaire a été effectué en vue de séparer les trois sous-populations monocytaires présentes dans le sang périphérique et le cerveau des souris à J0, J7 (non traitées et traitées) et J12 (traitées) p-i. Pour ces deux expérimentations, 500 000 PBMC ont été marquées par différents anticorps couplés à des fluorochromes (Tableau 8) et du Live-Dead a été ajouté afin de discriminer les cellules vivantes des mortes. Le protocole de marquage a été effectué en suivant les recommandations des fournisseurs (Tableau 8). Un tube de cellules non marquées, des monomarquages sur billes et sur cellules ainsi que des contrôles isotypiques ont été effectués afin de vérifier les résultats. Pour chaque échantillon, l'intégralité des cellules a été analysée afin de maximiser le nombre de monocytes présents dans chaque sous-population. Les échantillons présentant un nombre trop faible de cellules vivantes (moins de 20 000 dans le sang périphérique, 110 000 dans la rate et 2 000 dans le cerveau) et un nombre trop faible de monocytes dans chaque sous-population (50, 250 et 15 cellules, dans le sang périphérique, la rate et le cerveau respectivement) ont été retirés de

l'analyse finale. La cytométrie en flux a été menée sur un cytomètre LSR Fortessa et le tri cellulaire sur un Influx™ (BD Bio-Sciences). L'analyse des résultats a été menée à l'aide du logiciel FlowJo™.

Tableau 8 : Marqueurs analysés sur les PBMC issus du sang périphérique, du cerveau et de la rate des souris par cytométrie en flux

ANTICORPS	FLUOROCHROME	FOURNISSEUR	ORGANES ETUDIES	EXPERIMENTATIONS
Live-Dead	Zombie Aqua	Biolegend	Sang, Cerveau, Rate	Cytométrie, Tri cellulaire
F4/80	PeVio615	Miltenyi	Cerveau, Rate	Cytométrie, Tri cellulaire
CD45	PE Vio 770	Miltenyi	Cerveau, Rate	Cytométrie, Tri cellulaire
CD11b	FITC	Miltenyi	Sang, Cerveau, Rate	Cytométrie, Tri cellulaire
Ly6C	VioBlue 451	Miltenyi	Sang, Cerveau, Rate	Cytométrie, Tri cellulaire
LY6G	APC	Miltenyi	Sang, Cerveau	Tri cellulaire
CCR2	APC	Miltenyi	Sang, Cerveau, Rate	Cytométrie
CX3CR1	BV 711	Biolegend	Sang, Cerveau, Rate	Cytométrie
CMH-II	PerCP Vio 700	Miltenyi	Cerveau, Rate	Cytométrie
CD36	PE	SantaCruz	Sang, Cerveau, Rate	Cytométrie
CD163	AF680	Anticorps-enligne	Sang, Cerveau, Rate	Cytométrie

Expression génique de marqueurs pro- et anti-inflammatoires par les sous-populations monocytaires par RT-qPCR

Le tri cellulaire précédemment effectué a permis d'isoler les trois populations monocytaires dans le sang périphérique et le cerveau des souris aux différents temps de la cinétique. A la suite du tri cellulaire, du tampon de lyse a immédiatement été ajouté sur les cellules et leurs ARNm ont été extraits selon le protocole d'extraction du fournisseur (ReliaPrep™ RND Cell Miniprep System, Promega). Le traitement de nos échantillons à la DNAse a permis de supprimer les potentielles contaminations par de l'ADN génomique. La synthèse d'ADNc a été effectuée en suivant les recommandations du fournisseur (kit Verso™, Invitrogen). Différents gènes pro- et anti-inflammatoires ont été amplifiés et analysés par RT-qPCR sur un LightCycler 480 en utilisant du SYBR Green I Maxter Mix (Roche). Les séquences des amorces des gènes étudiés (Eurogentec) ont été conçues à l'aide du logiciel Primer3 (Tableau 9). La GAPDH a été utilisée comme gène de ménage. Une quantification relative des niveaux d'expression des gènes étudiés a été réalisée à l'aide d'une gamme de concentrations réalisée sur le pool d'échantillons testés. La pente, l'efficacité, l'erreur ainsi que les valeurs des Ct (nombre seuil de cycle nécessaire à l'amplification) et des Tm (« melting temperature ») ont été contrôlées afin de valider les résultats obtenus. Notamment, les amplifications avec des valeurs d'efficacité inférieures à 1,7 et supérieures à 2,3 n'ont pas été analysées.

Tableau 9 : Séquences d'amorces murines utilisées en RT-qPCR

GENES	SENS	ANTISENS
GAPDH	5'-ACA-CAT-TGG-GGG-TAG-GAA-CA	5'-AAC-TTT-GGC-ATT-GTG-GAA-GG
NRF2	5'-CCG-TCC-AGG-AGT-TCA-GAG-AG	5'-CTC-GCT-GGA-AAA-AGA-AGT-GG
CD36	5'-GAG-CAA-CTG-GTG-GAT-GGT-TT	5'-GCA-GAA-TCA-AGG-GAG-AGC-AC
HMOX1	5'-CCA-GAG-TGT-TCA-TTC-GAG-CA	5'-CAC-GCA-TAT-ACC-CGC-TAC-CT
HIF-1A	5'-TCA-GCA-TAC-AGT-GGC-ACT-CA	5'-AAG-GGA-GCC-ATC-ATG-TTC-CA
COX-2	5'-GCT-CGG-CTT-CCA-GTA-TTG-AG	5'-AGA-AGG-AAA-TGG-CTG-CAG-AA
ALOX15	5'-GTC-AGA-GAT-ACT-GGT-CGC-CG	5'-GTT-CAG-GAA-CCA-CAG-GGA-GG

Dosage des concentrations de cytokines pro- et anti-inflammatoires dans les plasmas et les cerveaux des souris par LEGENDplex™

Comme cela a été énoncé précédemment, les plasmas et une partie des broyats de cerveaux prélevés dans les groupes de souris sacrifiées aux différents temps ont été gardés afin de doser les concentrations de cytokines pro- et anti-inflammatoires par des kits LEGENDplex™ Custom Panel (BioLegend). Ces tests immunologiques utilisant des billes fluorescentes conjugués à des anticorps utilisent le même principe que les méthodes d'ELISA sandwich classiques, mais ont l'avantage de pouvoir doser simultanément et dans un même échantillon de nombreux marqueurs différents par cytométrie en flux. Ici, nous avons dosé les cytokines suivantes : TNFα, IL-1β, IL-6 (cytokines pro-inflammatoires), IL-10 (cytokine anti-inflammatoire), CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10 (chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites inflammatoires), CXCL1, CXCL5 (chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles), CCL17 et CCL22 (chimiokines impliquées dans le recrutement des LTh2 et LT régulateurs). Le protocole a été effectué en suivant les recommandations du fabricant. L'intensité de la fluorescence mesurée par le cytomètre est proportionnelle à la concentration des cytokines présentes dans chaque échantillon. L'analyse des résultats a été menée sur le logiciel LEGENDplex™ Data Analysis (Biolegend). Chaque échantillon a été dosé en duplicat et les points hors gamme ont été supprimés de l'analyse finale.

Effet de la CQ sur les macrophages péritonéaux et les GR murins *in vitro*

Les macrophages péritonéaux de souris saines et âgées de 10 à 15 semaines, ont été prélevés par lavage de la cavité péritonéale avec 5 mL de NaCl 0,9% stérile puis centrifugés (1500 rpm, 10min). Le culot a été remis en suspension dans 1mL de DMEM (Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific) où ont été ajouté 50µL de sérum de veau fœtal inactivé (Thermo Fisher Scientific) et 10µL de pénicilline/streptomycine à 5000 U/mL

(Thermo Fisher Scientific). Les cellules (200 000/puits) ont ensuite été déposées dans les puits avant d'être incubées pendant 2h à l'étuve (37°C, 5% de CO_2). En parallèle, des souris saines et infectées par *P. berghei ANKA* ont été euthanasiées au CO_2 et immédiatement exsanguinées par prélèvement sanguin au niveau de la veine cave. Le sang a été récupéré dans des tubes héparinés puis centrifugé (1500 rpm, 5min) afin d'éliminer le plasma. Les GR sains et infectés ont été séparés des PBMC par centrifugation en gradient de densité puis lavés au $DPBS^{-/-}$. Au bout des 2h d'incubation, les cellules n'ayant pas adhéré au fond des puits ont été éliminées par lavage au DPBS, les monocytes ayant la capacité d'adhérer au plastique. Six différentes conditions ont été testées : macrophages seuls, macrophages + CQ, macrophages + GR sains, macrophages + GRi, macrophages + GR sains + CQ, macrophages + GRi + CQ. En fonction des puits, les macrophages ont donc été mis en présence de 100 000 GR sains ou infectés et/ou de chloroquine (à 100µM). Au bout de 4h d'incubation (37°C, 5% de CO_2), le surnageant a été jeté et du tampon de lyse rajouté afin de lyser les monocytes en vue de l'extraction de leur ARNm. Le protocole d'extraction, de synthèse d'ADNc et de RT-qPCR a été décrit ci-dessus. L'expression génique de *Nrf2*, *PPARγ*, *CD36*, *HMOX1*, *HIF-1α* et *NQO1* a été mesurée. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 9 auxquelles il faut rajouter celle de *PPARγ* (sens 5'-AAT-GCG-AGT-GGT-CTT-CCA-TC ; antisens 5'-CTG-TGA-GAC-CAA-CAG-CCT-GA) et de *NQO1* (sens 5'-GGC-TGC-TTG-GAG-CAA-AAT-AG ; antisens 5'- TTC-TCT-GGC-CGA-TTC-AGA-GT). La GAPDH a été utilisée comme gène de ménage.

Analyse statistique

Le test non paramétrique U de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons des variables entre deux groupes. Les résultats ont été analysés sur le logiciel GraphPad Prism et le taux de significativité de ces tests a été fixé à $p<0,05$.

II-3. Résultats et discussions

II-3.1) Présentation du modèle

Des souris C57BL/6 (8 souris non traitées et 5 souris traitées à la CQ) ont été infectées par *P. berghei ANKA* et suivies quotidiennement. La figure 18 représente la parasitémie, le poids et le score neurologique des souris non traitées par la CQ et décédées à J7-J8 post-infection (p-i) des conséquences du paludisme cérébral (en rouge) et des souris traitées tardivement par la

CQ à J6-J7-J8-J9 p-i et ayant survécues à l'infection palustre (en bleu). A J6 p-i, la parasitémie de l'ensemble des souris (traitées et non traitées) était d'environ 3,4% (Figure 18-A). A J7 et J8 p-i, les parasitémies des souris non traitées et mourantes s'élevaient respectivement à 4,6 et 5,3%. Des tests d'ajustements ont permis de déterminer que le traitement tardif par la CQ (25mg/kg/jour/souris) était inefficace sur les souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* présentant une parasitémie supérieure à 4%. Il a donc été choisi de traiter les souris dès J6 p-i et ce jusqu'à la négativité de leur parasitémie. Ainsi, après l'injection d'une dose unique de CQ, les souris traitées à J7 p-i présentaient une parasitémie moyenne de 1,7%. A J8 p-i, et après deux jours de traitement par la CQ, cette dernière était proche de zéro malgré la présence de quelques GRi encore visibles au microscope. Dès J9, la parasitémie des souris traitées par la CQ était négative. Ces souris ont été surveillées jusqu'à J25 p-i sans que la parasitémie n'évolue (résultats non montrés). De façon surprenante, le poids des souris infectées, traitées et non traitées, n'a pas évolué au cours de l'infection palustre ou de sa résolution (Figure 18-B), contrairement aux données de la littérature indiquant une diminution du poids des souris infectées. En parallèle, un score neurologique (RMCBS) a été déterminé en évaluant 10 paramètres comportementaux chez la souris (Figure 18-C). Le score maximal de 20 a été observé chez l'ensemble des souris jusqu'à J6 p-i suggérant peu ou pas de symptôme neurologique visible. Si la CQ permet de garder un score neurologique stable, ce dernier diminue de moitié et est inférieur à 10 chez les souris non traitées à J7-J8 p-i confirmant bien une atteinte neurologique importante des souris à ce stade de l'infection et validant le protocole d'administration de la CQ dès J6 p-i.

D'autres études ont été menées sur des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* et traitées tardivement à la CQ (499–504). L'équipe de Dai *et al* a ainsi infecté des souris C57BL/6 femelles âgées de 4-6 semaines par *P. berghei ANKA* et les ont traitées avec de la CQ (20mg/kg/jour) à J7 p-i, et ce pendant 10 jours (500). La parasitémie des souris traitées est devenue négative après trois jours de traitement par la CQ, comme cela a été le cas dans notre étude. D'autres travaux ont montré que des souris C57BL/6 âgées de 6 à 8 semaines infectées par *P. berghei ANKA* et traitées dès J6 pendant 7 jours à la CQ (25mg/kg/jour) par voie orale, présentaient une parasitémie négative à J16 p-i (499, 503). La différence entre cette étude et nos résultats pourrait s'expliquer par le choix du sexe des souris (femelle versus mâles dans notre étude) et/ou de la voie d'administration de la CQ (gavage versus injection intrapéritonéale dans notre modèle). En effet, une autre étude effectuée sur des souris C57BL/6 femelles âgées de 7 semaines, infectées par *P. berghei ANKA* et traitées dès J4

(lorsque la parasitémie était supérieure à 2,5%) et ce pendant 7 jours par la CQ (25mg/kg/jour, voie orale), a également observé une négativité de la parasitémie plus tardive (J11 p-i) par rapport à notre étude, mais sans recrudescence après plus de 4 mois de surveillance (501). En revanche, une dernière étude menée sur des souris C57BL/6 mâles âgées de 7 à 8 semaines, infectées par *P. berghei ANKA* et traitées à J7-J8-J9 p-i à la CQ (15mg/kg/jour) par voie intra-péritonéale, a conduit à la négativité de la parasitémie à J10 p-i, mais une recrudescence a également été rapportée dès J13 p-i conduisant au décès de la plupart des souris à J25 p-i (504). La divergence par rapport aux résultats de notre étude peut s'expliquer par un traitement trop tardif des souris (J7 versus J6 dans notre modèle) et par une dose plus faible de CQ administrée (15 versus 25 mg/kg/jour dans notre étude).

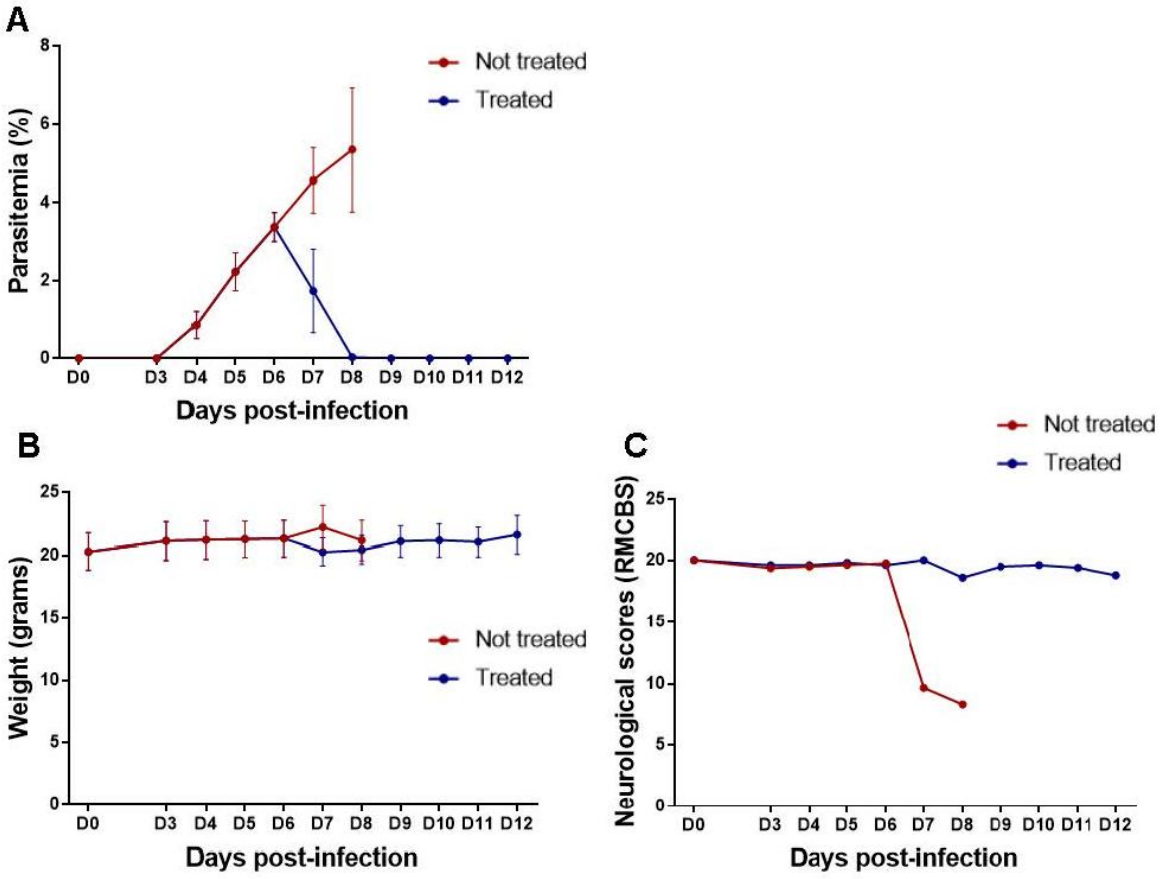


Figure 18 : Suivi quotidien de la parasitémie (A), du poids (B) et du score neurologique (C) des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* et traitées (bleu) ou non (rouge) tardivement à la chloroquine

Afin de vérifier si notre modèle de résolution est valide pour l'étude des principales voies d'activation et marqueurs qui nous intéressent, nous avons ensuite étudié les effets de la CQ sur les niveaux d'expression de différents gènes impliqués dans les réponses pro/anti-

inflammatoires et oxydantes : *Nrf2*, *PPARγ*, *CD36*, *HMOX1*, *HIF-1α*, et *NQO1* (Figure 19). Les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 ont été traités ou non par la CQ et mis en présence de GR sains et/ou infectés par *P. berghei ANKA*. Il est en effet connu que l'hémoglobine libre et l'hémozoïne sont pro-inflammatoires. Leur effet combiné à celui de la chloroquine est également à prendre en compte sur nos marqueurs d'intérêt. Chaque condition a été réalisée en triplicat et l'expérimentation a été effectuée deux fois de manière indépendante. Les résultats présentés dans la figure 19 reprennent l'ensemble des résultats obtenus lors des deux expérimentations.

Les résultats *in vitro* indiquent que les niveaux d'expression génique des facteurs de transcription Nrf2 et PPARγ ne sont pas modifiés en présence de CQ, de GR sains et GRi, ou de CQ + GR sains ou infectés. En revanche, la CQ limite l'expression de *CD36*, *HIF-1α* et de manière importante de *NQO1*, trois gènes sous le contrôle de Nrf2 (505–508). Pour *CD36*, la présence de GR sains ou infectés ne modifie pas l'effet de la CQ et son expression reste un peu plus faible qu'en présence de milieu de culture seul. Pour *HIF-1α*, l'ajout de GR sains à la CQ permet de rétablir son niveau d'expression. On peut noter également une augmentation de l'expression d'*HMOX1* par les macrophages en présence de GRi par rapport aux GR sains et que cette surexpression est corrigée par la CQ.

La CQ est connue pour être un inhibiteur de l'autophagie, or l'autophagie active la voie Nrf2. Zuo *et al* ont récemment montré que la CQ inhibait la translocation de Nrf2 au noyau conduisant à une diminution des réponses antioxydantes de l'organisme et à une augmentation de la production de ROS (Zuo and al 2019). Dans nos travaux, nous avons regardé l'expression génique du facteur de transcription Nrf2, l'étude de sa translocation au noyau sous l'effet de la CQ apporterait un résultat supplémentaire et serait pertinent pour mieux apprécier le rôle de la CQ dans l'activation de la voie Nrf2. L'inhibition de la translocation de Nrf2 au noyau sous l'effet de la CQ pourrait probablement conduire à une diminution de l'expression de ses gènes cibles tels que NQO1, CD36 ou HIF-1α comme cela est le cas dans notre étude.

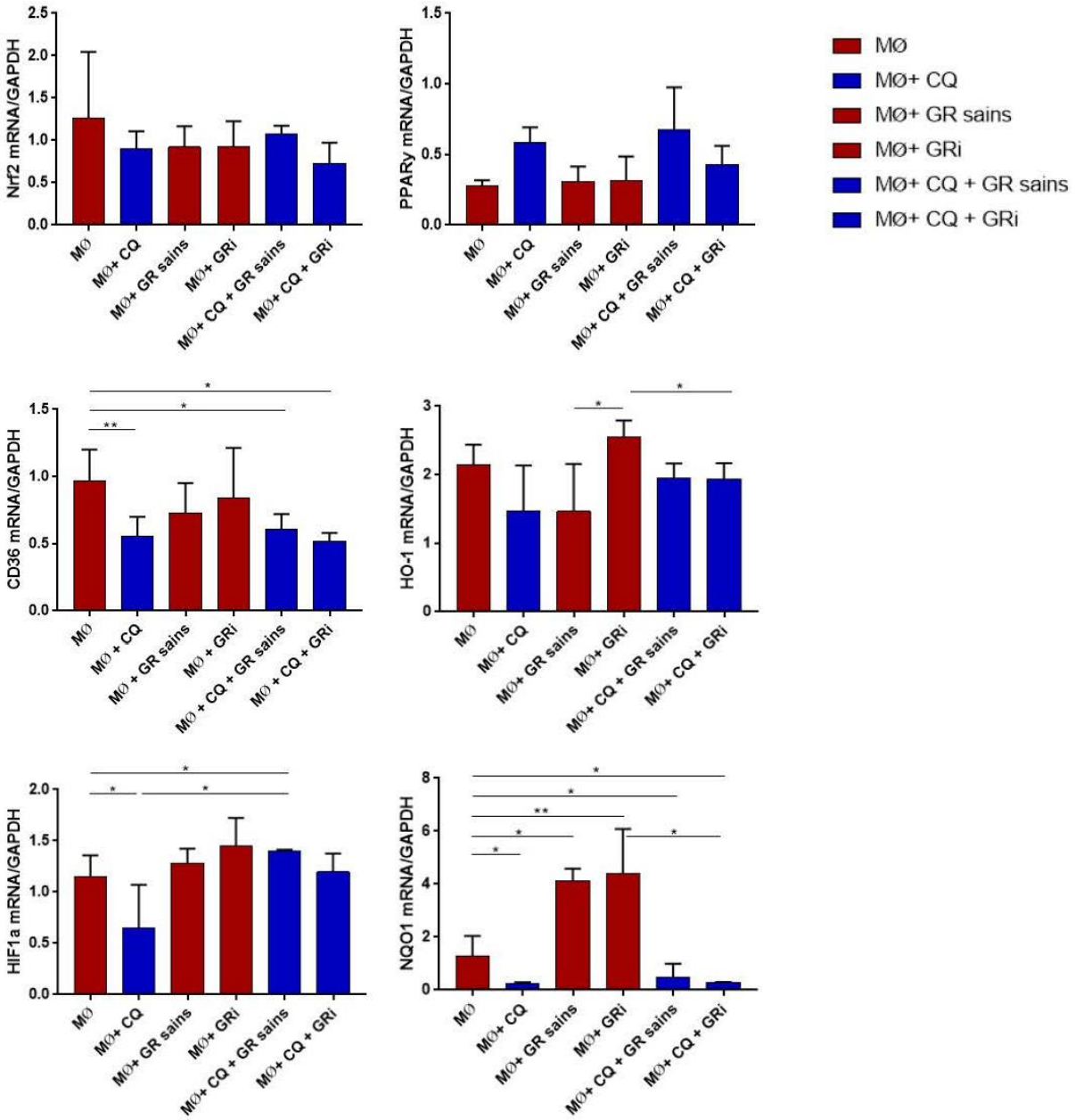


Figure 19 : Effets *in vitro* de la chloroquine sur les niveaux d'expression des gènes *Nrf2*, *PPARγ*, *CD36*, *HMOX1*, *HIF-1α* et *NQO1* sur les macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 activés par la présence de globules rouges sains ou infectés par *P. berghei ANKA*. MØ = macrophages, CQ = chloroquine, GRi = globules rouges infectés. * $p<0.05$, ** $p<0.01$

II-3.2) Cinétique des sous-populations au niveau cérébral, splénique et sanguin dans ce modèle

Afin de mieux comprendre l'implication des sous-populations monocytaires au cours du paludisme cérébral et de sa résolution, le sang périphérique, la rate et le cerveau des souris infectées par *P. berghei ANKA* et traitées ou non tardivement par la CQ ont été prélevés à différents temps de l'infection palustre et de sa résolution (J0-J3-J5-J7-J8-J12 p-i), et une analyse des sous-populations monocytaires et de la microglie a été menée par cytométrie en flux. Pour chacun des points de cinétique, des groupes allant de 3 à 6 souris ont été constitués. Une seconde expérimentation, menée de manière identique et indépendamment de la première, a été effectuée sur les points J3, J5 et J7 non traité. Les résultats présentés prennent en compte l'ensemble des données des deux expérimentations.

La stratégie de gating est présentée dans la figure 20. Brièvement, les monocytes ont été préalablement sélectionnés en fonction de leur taille et de leur granulosité (FSC-A/SSC-A) et les doublets ont été enlevés (gatings non montrés). Les cellules vivantes ont ensuite été séparées des cellules mortes par l'utilisation du Live-Dead. Les sous-populations monocytaires ont finalement été identifiées par leurs différents niveaux d'expression de Ly6C avec dans le sang périphérique (A) les $Ly6C^{hi}$ ($CD11b^{+}$ $Ly6C^{hi}$), $Ly6C^{int}$ ($CD11b^{+}$ $Ly6C^{int}$) et $Ly6C^{low}$ ($CD11b^{+}$ $Ly6C^{low}$) et dans la rate (B) les $Ly6C^{hi}$ ($CD45^{+}$ $CD11b^{+}$ $Ly6C^{hi}$) et les $Ly6C^{low}$ ($CD45^{+}$ $CD11b^{+}$ $Ly6C^{low}$). Dans le cerveau (C), la microglie ($F4/80^{+}$ $CD11b^{+}$ $CD45^{int}$) a été séparée des cellules myéloïdes ($F4/80^{+}$ $CD11b^{+}$ $CD45^{hi}$) par leurs différents niveaux d'expression du CD45, puis les trois sous-populations monocytaires ont été identifiées ($Ly6C^{hi}$, $Ly6C^{int}$ $Ly6C^{low}$).

La figure 21 présente l'évolution des sous-populations monocytaires au cours de notre cinétique dans le sang périphérique, le cerveau et la rate des souris. Une première analyse a permis de déterminer le pourcentage des sous-populations monocytaires et de la microglie parmi l'ensemble des leucocytes vivants. Une seconde analyse s'est intéressée à la variation de proportions des sous-populations monocytaires entre elles. Dans le sang périphérique des souris (A, panel haut), on observe, de J3 à J5, une augmentation du pourcentage des monocytes $Ly6C^{int}$ et $Ly6C^{low}$ parmi les leucocytes totaux. Le pourcentage des $Ly6C^{int}$ semble encore augmenter à J7 chez les souris non traitées alors que celui des $Ly6C^{low}$ semble diminuer (résultats non significatifs). Chez l'homme, une augmentation des monocytes intermédiaires a également été observée chez des adultes atteints de paludisme non compliqué et de paludisme grave à *P. falciparum* (186, 225, 226, 231, 458). De plus, si la plupart des

études effectuées chez l'homme indiquent une augmentation de la population de monocytes classiques au cours d'un paludisme non compliqué (225, 226, 229), Ogonda *et al* ont montré que cette population ne semble pas évoluer au cours d'un neuropaludisme chez l'enfant, résultat en accord avec nos observations dans notre modèle murin. L'évolution du pourcentage des monocytes non classiques Ly6C^{low} au cours d'une infection palustre est également discutée dans la littérature. En effet, en fonction des études, le pourcentage de cette sous-population monocytaire semble augmenter (227, 228), ne pas évoluer (226, 231), voire même diminuer comme cela a été montré lors de notre première étude chez l'enfant béninois (458). Dans ce modèle murin, l'analyse de l'évolution des proportions des trois sous-populations monocytaires entre elles (A, panel bas) indique que de J3 à J5, la proportion de Ly6C^{hi} diminue de 25 à 8% en faveur des Ly6C^{low} passant de 44 à 66%, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle les Ly6C^{hi} se différencient en Ly6C^{low} (192, 196–198). En revanche, de J5 à J7 pour les souris non traitées, les Ly6C^{low} diminuent en faveur des Ly6C^{int} passant de 26 à 40%. Le traitement tardif par la CQ permet de rétablir les proportions monocytaires basales. De façon intéressante, il permet également de maintenir la proportion de Ly6C^{low} de J5 à J7, tout en limitant l'augmentation des Ly6C^{int} à J7 (respectivement à 65% et 28,5%). Ces premiers résultats suggèrent un rôle potentiellement délétère des monocytes Ly6C^{int} et un rôle protecteur des Ly6C^{low} dans la physiopathologie du neuropaludisme.

Dans la rate des souris (B, panel haut), on observe de J3 à J5, une augmentation du pourcentage des monocytes Ly6C^{hi} et une diminution des Ly6C^{low} parmi les cellules vivantes. De J5 à J7, les Ly6C^{hi} continuent faiblement leur progression (non significatif), alors que le pourcentage de Ly6C^{low} bascule en faveur d'une nette augmentation. La cinétique du pourcentage relatif des trois sous-populations entre elles (B, panel bas) montre de J3 à J5 puis de J5 à J7 des pourcentages inverses entre les high et les low, avec un pic de hi à J5 et un pic de low à J7. Le traitement tardif par la CQ accentue ce phénomène, permettant d'augmenter fortement le pourcentage de Ly6C^{low} après seulement un jour de traitement, pour revenir à des pourcentages qui tendent à se rapprocher de l'état basal (B, panel bas). Il est intéressant de noter que le comportement des deux populations de monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{low} est quasiment inverse dans le sang et dans la rate de J3 à J5 puis de J5 à J8. Cependant, nous avions conclu à un rôle potentiellement positif des Ly6C^{low} dans le sang du fait de leur maintien à un pourcentage élevé grâce à la CQ de J5 à J7. Dans la rate, leur augmentation nette de J5 à J7 grâce à la CQ conforte cette hypothèse. D'autres équipes ont rapportés des résultats sur les monocytes, notamment Pai *et al* (233) qui décrivent une accumulation de monocytes Ly6C^{hi} dans le sang des souris infectées la veille de la survenue des symptômes

neurologiques, ce que nous observons dans notre cas dans la rate et non dans le sang. Schuman et al, par une approche de déplétion des monocytes Ly6C^{hi}, sont parvenus à limiter la neuroinflammation dans un modèle murin d'ECM, confirmant l'implication de cette population dans ce phénomène (234). Nos résultats complètent ces données puisqu'ils vont plutôt dans le sens de l'implication des monocytes Ly6C^{int} dans l'inflammation accompagnant le début des symptômes neurologiques, et d'un rôle positif des Ly6C^{low} dans la résolution.

Dans le cerveau (C), le pourcentage de la microglie, ou monocytes résidents du cerveau, représentant initialement 37% des leucocytes présents, semble légèrement diminuer à J3 pour augmenter de J5 à J7 (respectivement 28% puis 31 et 47%) bien que cette tendance ne soit pas significative. Nidwald *et al* ont quant à eux observé aucune modification du pourcentage de la microglie dans le cerveau de souris CBA/J infectées par *P. berghei ANKA* (212). Le traitement tardif par la CQ permet dans notre modèle de diminuer drastiquement le pourcentage microglial à 3-4% des leucocytes totaux à J7-J8, puis de l'augmenter à J12 pour revenir vers des valeurs plus représentatives de l'état basal. Ce résultat suggère une implication de la microglie dans les symptômes neurologiques dans ce modèle. Le phénotype de la microglie à J7 pour les souris non traitées permettra d'apporter des données supplémentaires informatives (voire paragraphes suivants). Concernant les sous-populations monocytaires, on observe entre J0 et J7 une augmentation des pourcentages des monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{int}, passant respectivement de 0,4 à 7,4% et de 2 à 11,2% des leucocytes totaux présents dans le cerveau (C, panel haut), sans évolution du pourcentage des Ly6C^{low}. Si ces résultats ne sont pas significatifs, probablement du fait du faible nombre de souris dans certains groupes, cette tendance suggère que les monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{int} sont fortement recrutés dans le cerveau des souris participant ainsi à la neuroinflammation, contrairement au Ly6C^{low}. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature indiquant un faible recrutement des monocytes Ly6C^{low} vers les sites inflammatoires (207) et une augmentation des Ly6C^{hi} dans les cerveaux des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* (233) comme c'est le cas dans notre étude. En revanche, nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Niewold *et al* indiquant une augmentation des trois sous-populations monocytaires et principalement des Ly6C^{low} dans le cerveau de souris CBA/J infectées par *P. berghei ANKA* à J8 p-i (212), ce qui peut être lié à la différence de fond génétique des souris entre les deux études. De plus, nos résultats indiquent une augmentation constante de la proportion monocytaire des Ly6C^{hi} passant de 9 à 31% associée à la diminution de celle des Ly6C^{low} passant de 38 à 13% tout au long de l'infection palustre de J3 à J7 (C, panel bas). Le traitement tardif par la CQ permet de limiter l'afflux des populations monocytaires au

cerveau. Il permet également de diminuer les proportions des monocytes Ly6C^{int} (bien que non significatif) en faveur de l'augmentation des Ly6C^{hi} et du maintien de la proportion de Ly6C^{low} à J7-J8 soulignant encore une fois le potentiel rôle délétère des monocytes Ly6C^{int} et protecteur des Ly6C^{low} dans notre modèle. De façon surprenante, entre J8 et J12, la CQ diminue la proportion de monocytes Ly6C^{hi} en faveur des Ly6C^{int} et de la microglie. Hugosson *et al* ont montré chez l'homme que la CQ permettait d'augmenter le nombre de monocytes CD14^{+} (495). D'après nos résultats, il semblerait donc que la CQ augmente, de façon tardive, la population de Ly6C^{int} en dépit des Ly6C^{hi} dans le cerveau des souris. Ce dernier résultat suggère que les monocytes Ly6C^{int} et la microglie pourraient jouer un rôle dans la résolution de la neuroinflammation de façon tardive.

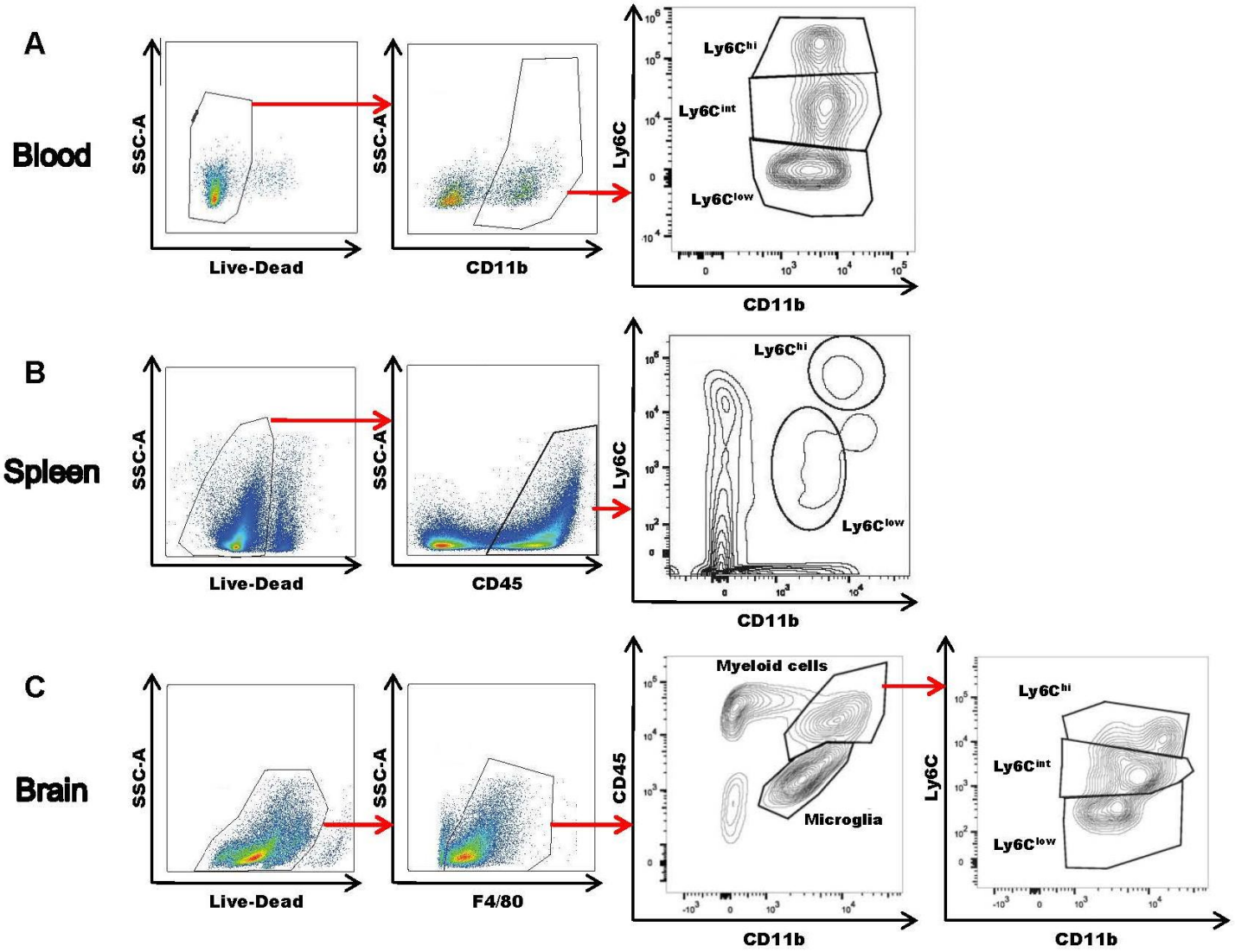


Figure 20 : Stratégie de gating des sous-populations monocytaires et de la microglie dans le sang périphérique (A), la rate (B) et le cerveau (C) des souris par cytométrie en flux. Les monocytes ont été préalablement sélectionnés en fonction de leur taille et de leur granulosité (FSC-A/SSC-A) et les doublets ont été enlevés (gatings non montrés). Les cellules vivantes ont ensuite été séparées des cellules mortes par l'utilisation du Live-Dead

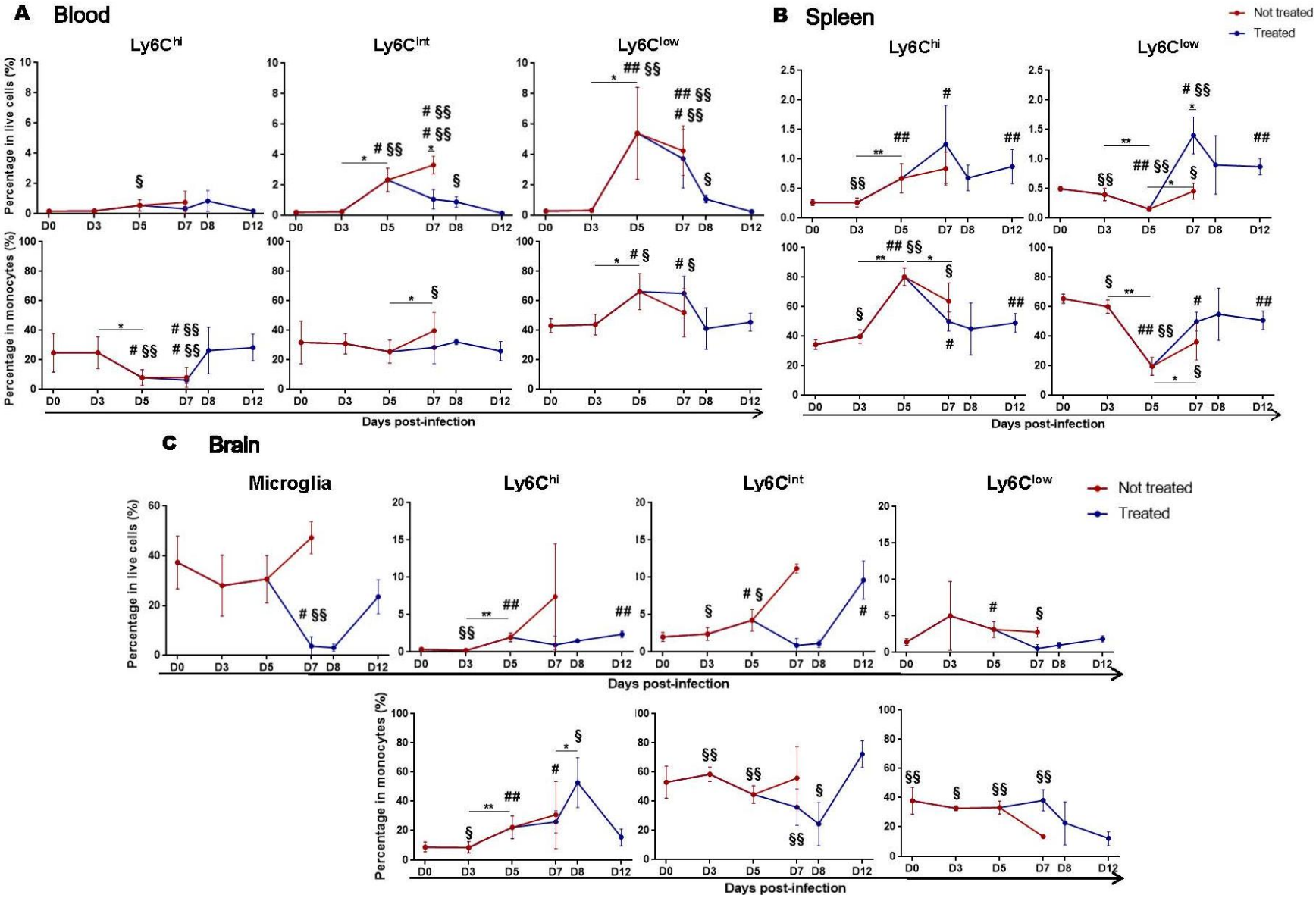


Figure 21 : Evolution des sous-populations monocytaires et de la microglie dans le sang périphérique (A), la rate (B) et le cerveau (C) des souris au cours de l'infection palustre et de sa résolution (traitement tardif par la chloroquine). Les pourcentages ont été déterminés parmi l'ensemble des cellules vivantes ainsi que parmi les sous-populations monocytaires entre elles. Les pourcentages ont été comparés chaque jour par rapport à ceux de J0 et J12 p-i, ainsi qu'au pourcentage du jour précédent : */** différence entre deux points successifs respectivement $p<0.05$ et $p<0.01$, #/## différence avec l'état basal à J0 respectivement $p<0.05$ et $p<0.01$, §/§§ différence avec le point J12 respectivement $p<0.05$ et $p<0.01$

II-3.3) Caractérisation des sous-populations monocytaires dans le modèle

II-3.3.1/ Etude protéique

L'étape suivante de ce travail a consisté à caractériser les sous-populations monocytaires au cours de la cinétique de l'infection palustre et de son traitement à l'aide de différents marqueurs présents à la surface des sous-populations monocytaires et de la microglie. La figure 22 présente les intensités de fluorescence médianes des marqueurs CD36, CD163 et CMH-II sur ces populations dans le sang périphérique (A), la rate (B) et le cerveau (C) des souris infectées.

Avant infection à l'état basal et comme décrit dans la littérature (207), on peut observer que ce sont les monocytes $Ly6C^{low}$ sanguins qui expriment majoritairement le récepteur CD36 impliqué dans la phagocytose non-opsonique des GRi comparé aux monocytes $Ly6C^{hi}$ et $Ly6C^{int}$. CD36 est une récepteur scavenger impliqué dans l'élimination d'éléments inflammatoires et oxydants comme les débris et cellules apoptotiques, les lipoprotéines LDL oxydées (oxLDL) et les GRi (266). *In vitro* mais également dans le modèle murin de paludisme à *P. berghei ANKA*, le rôle de CD36 dans la phagocytose des GRi a été bien décrit (257, 262). L'expression réduite de CD36 à la surface des monocytes $Ly6C^{int}$ et $Ly6C^{low}$ au cours de l'infection palustre suggère ainsi une capacité réduite de ces populations à phagocyter de manière non-opsonique les GRi, ou d'éliminer des cellules ou débris apoptotiques. La fonction de ce récepteur peut passer par une internalisation du complexe récepteur-ligand, ce qui pourrait expliquer une présence moindre à la surface des cellules (509). Cependant, le profil d'expression du gène CD36 par ces populations de monocytes étant comparable à celui de la protéine (Figure 24 C, D), l'hypothèse d'une internalisation du récepteur est peu probable. La surexpression de CD36 à J5 par les $Ly6C^{hi}$ semble insuffisante pour contrôler la parasitémie et limiter le développement de l'infection. Cette surexpression peut également témoigner d'une activité accrue d'élimination de microvésicules. L'implication de CD36 dans l'élimination de vésicules extracellulaires a été observée chez des patients présentant une arthrite rhumatoïde (510) et l'implication des microvésicules dans la pathologie sévère palustre est bien documentée (310). Le traitement par la CQ permet de revenir à des intensités de fluorescence physiologiques observées à J0.

Dans la rate, si CD36 n'est pas exprimé en début d'infection par les monocytes $Ly6C^{hi}$ et $Ly6C^{low}$, on peut cependant observer une très nette augmentation de son expression à J7 à la surface de ces deux sous-populations traduisant une probable activité accrue de phagocytose

des GRi dans cet organe. Le traitement tardif par la CQ n'altère pas cette expression qui est maintenue J7-J8, puis revient à des valeurs observées en condition physiologique à J0. Dans le cerveau des souris, un pic d'expression de CD36 est observé à J3 sur la microglie et les monocytes Ly6C^{int} et Ly6C^{low} suivi d'une diminution de son expression à J5-J7. Ces résultats suggèrent que lors des stades avancés du paludisme cérébral, l'infection inhibe les propriétés phagocytaires de la microglie et des monocytes Ly6C^{int} et Ly6C^{low} présents dans le cerveau des souris. De façon très intéressante, le traitement tardif par la CQ augmente très fortement l'expression de CD36 à la surface des trois sous-populations monocytaires et dans une moindre mesure sur la microglie dès le premier jour de traitement, à J7, qui diminue ensuite pour tendre vers un niveau d'expression plus physiologique, semblable à celle observée à J0. D'autres études confortent nos résultats et décrivent une augmentation de l'expression des gènes cibles de Nrf2, dont *CD36*, par la CQ (511, 512). Ces résultats viennent consolider notre analyse évoquant le rôle protecteur du récepteur CD36 sur les monocytes au cours d'un paludisme cérébral (81, 260, 262, 458, 513).

Le CD163 est également un récepteur scavenger intervenant dans la phagocytose et l'élimination du complexe hémoglobine/haptoglobine et potentiellement de l'hémoglobine seule. L'haptoglobine est une protéine de la réaction inflammatoire capable de se fixer à l'hémoglobine libérée lors de l'éclatement des GRi formant ainsi un complexe Hb/Hp qui sera éliminé par le récepteur CD163 présent à la surface des macrophages de la rate (514). Ainsi, CD163 possède des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes en régulant positivement l'expression d'autres médiateurs tels que l'IL-10 ou HO-1. Comme cela a été décrit dans la littérature (515), nos résultats indiquent que les monocytes Ly6C^{hi} dans les trois compartiments étudiés expriment majoritairement le récepteur CD163 comparé aux deux autres populations monocytaires. Dans le sang, jusqu'à J7, son expression ne semble pas évoluer à la surface des Ly6C^{hi} et Ly6C^{int} au cours de l'infection palustre mais on observe en revanche une diminution de son expression sur les Ly6C^{low} suggérant une diminution de leurs fonctions anti-inflammatoires et oxydantes. A partir de J7, le traitement par la CQ diminue l'expression de CD163 à la surface des monocytes Ly6C^{hi} l'augmente à la surface des Ly6C^{int} et Ly6C^{low} de façon plus tardive à J12. Dans la rate et tout comme le CD36, l'expression de CD163 évolue de façon similaire entre les deux sous-populations monocytaires. Son expression augmente à J5 puis diminue à J7 suggérant une plus faible réponse anti-inflammatoire et oxydante ainsi qu'une capacité réduite des monocytes à éliminer les complexes Hb/Hp. Le traitement par la CQ supprime son expression à la surface des deux sous-populations monocytaires. Ces résultats vont dans le sens de l'étude de Schaer *et al*

indiquant que la CQ altère l'internalisation du complexe Hb/Hp par le CD163 bloquant ainsi son catabolisme et augmentant les concentrations d'Hb intracellulaire (491). Dans le cerveau, son expression ne semble pas évoluer à la surface des monocytes Ly6C^{int}, ni de la microglie au cours de l'infection palustre, elle est en revanche largement diminuée à J5-J7 sur les monocytes Ly6C^{hi}. De plus, si le traitement par la CQ diminue l'expression de CD163 à la surface des Ly6C^{int} et de la microglie, il permet en revanche de rétablir son expression à la surface des Ly6C^{hi} de façon tardive à J12. Si on se focalise plus précisément sur les monocytes Ly6C^{hi} qui expriment préférentiellement CD163, on observe deux périodes de surexpression : à J5 dans la rate, jour de démarrage des symptômes neurologiques, et à J12 dans le cerveau, temps de résolution. Ces résultats suggèrent une implication de CD163 dans l'initiation des symptômes neurologiques ou qu'il peut en constituer un marqueur. Un rôle positif plus tardif peut lui être attribué, retrouvé également avec les monocytes Ly6C^{low} sanguins. On peut donc imaginer qu'une implication trop précoce de CD163 témoigne de l'aggravation clinique du neuropaludisme. Dans la littérature, de nombreux travaux se sont intéressés à la forme plasmatique soluble de CD163 (sCD163). Ces études l'ont souvent associé à la sévérité lors de pathologies inflammatoires et notamment lors de paludismes graves (352, 516, 517). Le rôle de sa forme membranaire à la surface des monocytes reste plus indéterminé. Weinberg *et al* ont mis en évidence que l'augmentation de CD163 à la surface des monocytes était corrélée à la gravité palustre chez des enfants tanzaniens (352). De plus, une augmentation de l'expression de CD163 a été observée à la surface des monocytes classiques et non-classiques chez l'homme lors d'une infection par le VIH (515) et à la surface des trois sous-populations monocytaires humaines chez les sujets asthmatiques (518). En revanche, Aubouy *et al* ont montré que son expression était quant à elle associée à une amélioration clinique dans le cadre du paludisme chez la femme enceinte et à une augmentation du poids des enfants à la naissance (259). Nos résultats obtenus dans le modèle expérimental de paludisme cérébral vont plutôt dans les sens d'un marqueur de sévérité.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'expression du récepteur CMH-II. Ce récepteur n'a pu être étudié que dans deux compartiments, la rate et le cerveau. Les monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{low} présents dans la rate à l'état physiologique (J0) ne présentent pas à leur surface de molécule du CMH-II, mais le surexpriment à J5, puis à nouveau à partir de J7 ou J8 en présence de CQ. Ce résultat est en accord avec différents travaux menés dans un modèle murin non létal de paludisme (232, 519). En effet, chez la souris infectée par *P. chabaudi*, il a été montré que les monocytes Ly6C^{hi} présents dans la rate en début d'infection exprimaient faiblement les molécules du CMH-II traduisant un défaut dans leur fonction de CPAg et dans

l'activation des LT CD4. Au cours de l'infection et en présence de parasites, ces monocytes semblaient cependant capables de se différencier et adopter un phénotype de CPAg important pour contrôler l'infection plasmodiale au stade sanguin en activant la différenciation des LT CD4+, mais également potentiellement délétère *via* l'activation des LT cytotoxiques d'après Wilson *et al* (237).. Dans notre étude, CMH-II était faiblement exprimé à la surface des monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{low} à J7 p-i, suggérant qu'à ce stade, les monocytes ne sont plus capables d'activer les réponses lymphocytaires nécessaires au contrôle de l'infection. Une diminution de l'expression de HLA-DR, l'équivalent du CMH-II chez l'homme, a également été observée à la surface des monocytes dans différentes études chez des enfants atteints de paludisme grave et notamment du neuropaludisme (520, 521). Cela suggère que *Plasmodium* a la capacité de limiter la présentation antigénique par les monocytes. Dans notre modèle, le traitement tardif par la CQ permet de rétablir ce phénomène dans le cerveau. En effet, le traitement tardif par la CQ induit à J7 une surexpression du CMH-II à la surface des trois populations monocytaires présentes dans le cerveau et dans une moindre mesure sur la microglie, puis diminue son expression à J8-J12 pour tendre vers des valeurs physiologiques observées à J0. Pourtant, les données de la littérature indiquent que la CQ altère l'expression de CMH-II (492, 493) et de ce fait, diminue l'activation des LT et la libération des cytokines pro-inflammatoires qu'ils produisent, conduisant à la protection des souris infectées par *P. berghei ANKA* (493). Ce résultat pourrait suggérer que la résolution de l'infection passe par une surexpression de CMH-II sur les monocytes infiltrés et la microglie, induisant une activation de la réponse lymphocytaire et conduisant à la mise en place rapide d'une réponse immunitaire nécessaire au contrôle de l'infection à J7 au niveau du cerveau.

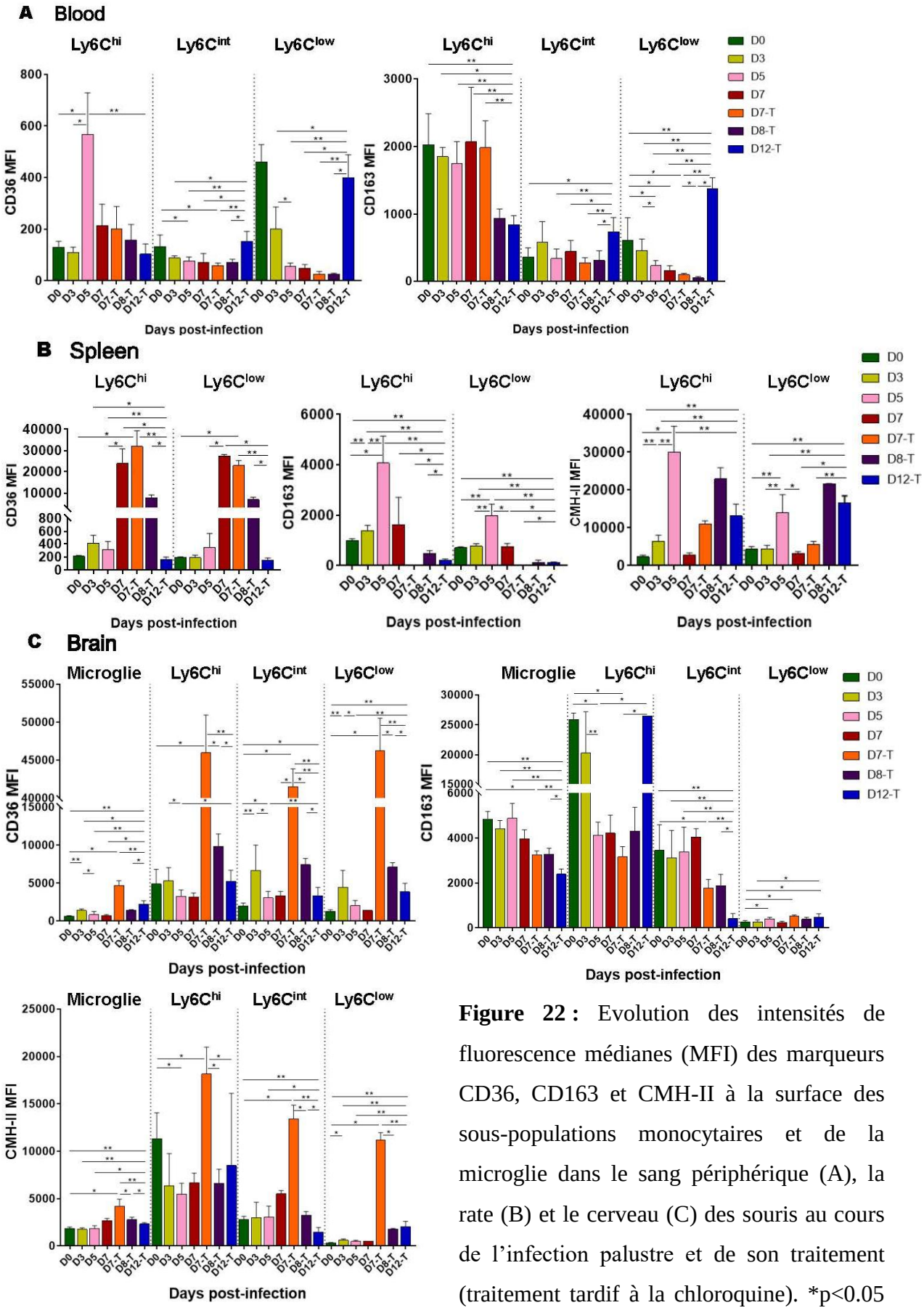


Figure 22 : Evolution des intensités de fluorescence médianes (MFI) des marqueurs CD36, CD163 et CMH-II à la surface des sous-populations monocytaires et de la microglie dans le sang périphérique (A), la rate (B) et le cerveau (C) des souris au cours de l'infection palustre et de son traitement (traitement tardif à la chloroquine). *p<0.05 **p<0.01

II-3.3.2/ Etude génique

Afin de mieux caractériser les trois sous-populations monocytaires, ces dernières ont été triées dans le cerveau et le sang périphérique des souris infectées par *P. berghei ANKA* à J0 et J7. Les populations monocytaires présentes dans le cerveau et le sang des souris traitées par la CQ à J7 et J12 ont également été triées. Leur ARNm a été extrait afin d'étudier l'expression de différents gènes impliqués dans les réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes par RT-qPCR. La figure 23 présente la stratégie de gating des sous-populations monocytaires. Brièvement, les monocytes/macrophages ont été sélectionnés en fonction de leur taille et de leur granulosité (gating FSC-A/SSC-A non montré), puis les doublets ont été exclus (gatings FSC-A/FSC-W et SSC-A/SSC-W non montrés). Les cellules vivantes ont ensuite été sélectionnées grâce à l'utilisation de Live-dead. Dans le cerveau, la microglie a été séparée des cellules myéloïdes et des lymphocytes restants par leur expression différentielle des marqueurs CD11b et CD45. Parmi les cellules myéloïdes, les monocytes ($CD11b^{+}$ $CD45^{hi}$ $Ly6G^{-}$) ont été séparés des neutrophiles ($CD11b^{+}$ $CD45^{hi}$ $Ly6G^{+}$) par leur absence d'expression du marqueur Ly6G dans le cerveau et le sang des souris. Les trois sous-populations monocytaires ont enfin été discriminées par leur niveau d'expression de Ly6C ($Ly6C^{hi}$, $Ly6C^{int}$, $Ly6C^{low}$).

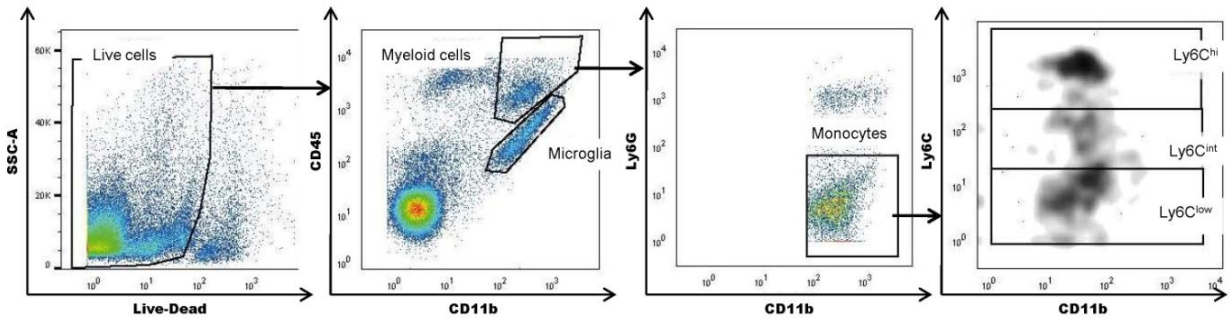


Figure 23 : Stratégie de gating des sous-populations monocytaires et de la microglie dans le cerveau et le sang périphérique des souris à J0, J7 et J12. Les monocytes ont été préalablement sélectionnés en fonction de leur taille et de leur granulosité (FSC-A/SSC-A, gating non montré) et les doublets ont été enlevés (FSC-A/FSC-W et SSC-A/SSC-W, gatings non montrés). Les cellules vivantes ont ensuite été séparées des cellules mortes par l'utilisation du Live-Dead

Si le tri n'a posé aucun problème pour l'étude des populations monocytaires de la circulation périphérique et de la microglie, il s'est avéré bien plus délicat pour celle des sous-populations monocytaires infiltrées dans le cerveau. En effet, seul un faible nombre de cellules a pu être

trié dans chacune des trois sous-populations monocytaires du cerveau en particulier en début d'infection. Nous avons donc choisi de pooler certains échantillons afin de permettre une analyse en RT-qPCR. Malheureusement cela n'a pas suffit à obtenir des résultats solides et reproductibles. Nous avons donc choisi de présenter ici uniquement les résultats obtenus pour l'étude de la microglie et celles des trois sous-populations monocytaires dans le sang périphérique des souris. Pour la microglie, 21 souris ont été utilisées (6 J0, 5 J7-T, 5 J7-NT et 5 J12-T) et l'analyse de chaque gène a été effectuée en duplicat. Pour le sang, 13 souris ont été utilisées (3 J0, 4 J7-T, 4 J7-NT et 2 J12-T) et l'analyse des gènes sur chacune des populations monocytaires a été effectuée en duplicat. La figure 24 présente les niveaux d'expression des gènes *Nrf2*, *CD36*, *HMOX1*, *HIF-1α*, *COX-2* et *ALOX15* par la microglie et les sous-populations monocytaires de la circulation périphérique chez les souris infectées par *P. berghei ANKA* à J0 et J7 et traitées tardivement à la CQ (J7-T et J12-T). Comme cela a déjà été énoncé précédemment, Nrf2 est un facteur de transcription connu pour réguler un ensemble de gènes impliqués dans les mécanismes anti-inflammatoires et antioxydants de l'organisme, y compris *CD36* et *HMOX1* et *HIF-1a*, marqueur de l'hypoxie. COX-2 et la 12/15-LOX (protéine codée par le gène *ALOX15*) sont quant à elles des enzymes connues pour intervenir dans le métabolisme de l'acide arachidonique. La première conduit, entre autre, à la production de prostaglandines comme la PGE2 pro-inflammatoire, quand la seconde produit des leucotriènes et notamment des lipoxines (par exemple la lipoxine LXA4) ou des résolvines et protectines aux propriétés anti-inflammatoires (522).

Dans le cerveau des souris, les niveaux d'expression des gènes *Nrf2*, *CD36*, *HMOX1*, *HIF-1α* et *COX-2* dans la microglie ne semblent pas évoluer au cours de l'infection palustre de J0 à J7 malgré une tendance à une légère augmentation de leurs expressions (résultats non significatifs). En revanche, l'expression de *ALOX15* diminue nettement à J7, suggérant une inhibition franche de son expression avec ou sans CQ. Avec le traitement à la CQ, l'expression de *HMOX1* à J7 augmente par rapport à J0 ($p<0,05$) alors que l'expression de *COX-2* diminue par rapport à J7 non traité ($p<0,05$), en accord avec les données de la littérature (511, 512, 523). A J12, le niveau d'expression d'*ALOX15* dans la microglie est multiplié par plus de 3, suggérant une levée de l'inhibition de son expression permettant un retour vers les niveaux d'expression physiologiques observés à J0.

Dans le sang périphérique, à l'état physiologique (J0), les monocytes $Ly6C^{hi}$ expriment les gènes *Nrf2* et *ALOX15* et très faiblement *CD36*, *HMOX1*, *HIF-1α* et *COX-2*. Les monocytes $Ly6C^{low}$ expriment quant à eux les gènes *CD36*, *HMOX1*, *COX-2* et *ALOX15* et très faiblement *Nrf2* et *HIF-1α*. Les monocytes $Ly6C^{int}$ ne semblent pas exprimer (ou très peu)

l'ensemble de ces gènes. Cependant, au cours de l'infection palustre, on observe une diminution de l'expression de *Nrf2* par toutes les sous-populations monocytaires à J7 et J7 traité, expression qui réaugmente à J12 pour revenir à des valeurs comparables à J0. En sachant que Nrf2 régule l'expression de *CD36* et *HMOX1,* il n'est pas surprenant d'observer une diminution similaire de l'expression de CD36 par les trois sous-populations monocytaires bien qu'elle ne soit significative que pour les Ly6C^{int} et Ly6C^{low}. Une diminution de l'expression de *HMOX1* est également observée pour les Ly6C^{low}. A J12, les niveaux d'expression de *CD36* et *HMOX1* sont rétablis et comparables à ceux observés à J0. *In vitro,* nous avions observé que la CQ seule, ou en présence de GR sains ou infectés, diminuaient l'expression génique de CD36 et NQO1, mais n'avait que peu d'effet sur *Nrf2* et *HMOX1*. Cependant, la diminution dès J7 non traité du niveau d'expression de CD36 laisse penser qu'il s'agit bien d'un effet infection, plus que d'un effet CQ. De plus l'inhibition de l'expression de Nrf2 qui contrôle l'expression de *CD36* et *HMOX1,* renforce cette hypothèse. L'expression de *HIF-1α* par les monocytes de la circulation périphérique semble quant à elle ne pas évoluer au cours du neuropaludisme. Ce résultat est en accord avec l'étude de Medana *et al* n'observant pas non plus d'augmentation de l'expression de *HIF-1α* par les macrophages lors de biopsies cérébrales issues de patients décédés de paludisme grave dont le neuropaludisme (524). En revanche, dans notre, étude, l'expression de *HIF-1α* par les monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{int} est plus faible à J7 en présence de CQ qu'à J0, puis augmente à J12 pour revenir à des niveaux d'expression comparables à J0. *In vitro,* nous avions également observé une diminution de l'expression d'*HIF-1α* en présence de CQ seule, ce qui suggère que l'effet observé ici pourrait être attribué au traitement. Dans leur étude, Thongchot *et al* ont également décrit une inhibition de l'expression de HIF-1α par la CQ (523).

L'expression de *COX-2* par les monocytes Ly6C^{low} dans le sang est totalement inhibée à J7, avec ou sans CQ. A J12, l'expression de ce marqueur est rétablie, suggérant un rôle bénéfique de *COX-2* dans la résolution du neuropaludisme *via* les monocytes Ly6C^{low}. Si son expression ne varie pas jusqu'à J7 chez les Ly6C^{hi} et Ly6C^{int}, le traitement par la CQ induit néanmoins une diminution de son expression à J7 par les Ly6C^{int}, suivie d'une réaugmentation à J12. Des études effectuées sur un modèle murin d'ECM ont indiqué que l'inhibition de *COX-2* conduit à un développement plus rapide de l'ECM et à une surmortalité des souris (525, 526). Ces résultats vont dans le sens de nos analyses suggérant un rôle protecteur de COX-2 dans un modèle murin d'ECM. En revanche, certaines études mettent en évidence une surexpression de COX-2 dans les cerveaux des souris (525, 527). Borges *et al* ont également démontré que contrairement aux C57BL/6, les souris BALB/c ne développent pas de paludisme cérébral

létal et aucune expression de COX-2 n'est retrouvée dans les cerveaux de ces souris (527). De plus, il a été montré que la CQ comme l'artésunate, traitement de première intention du neuropaludisme chez l'homme, conduit à l'inhibition de la production de PGE2 *via* la suppression de l'expression de *COX-2* (488, 490, 526, 528, 529). Ces résultats traduisent le rôle complexe de la voie d'activation COX-2 dans l'inflammation et sa résolution. Chez l'homme, des travaux ont mis en évidence le rôle protecteur de COX-2 et de la PGE2 contre les formes sévères de paludisme (neuropaludisme anémie sévère palustre, paludisme placentaire) (530–535). En effet, les concentrations plasmatiques de PGE2 et l'expression protéique et génique de COX-2 par les leucocytes étaient diminuées lors d'un paludisme grave (534). De plus, les concentrations plasmatiques de PGE2 responsable, entre autre, de l'inhibition de la production de TNFα (531), étaient inversement corrélées aux quantités d'IL-10 (533). Il a également été montré que les inhibitions de COX-2 et de PGE2, induites en partie par la phagocytose d'hémozoïne par les monocytes et la sécrétion d'IL-10 (531, 532), étaient associées à une production excessive de TNFα, une diminution de l'érythropoïèse et à une aggravation de l'anémie (530, 531). De plus, Sarr *et al* ont mis en évidence que la diminution de l'expression de *COX-2* était associée à un faible poids des enfants à la naissance (535). Enfin, une étude post-mortem a montré une augmentation de l'expression de COX-2 par les cellules endothéliales et les astrocytes, mais pas par les monocytes/macrophages dans les cerveaux de patients décédés de neuropaludisme suggérant un rôle central des monocytes dans l'implication de la voie d'activation COX-2 dans la neuroinflammation et sa résolution au cours du neuropaludisme (536).

De façon intéressante, l'expression de *ALOX15* est également inhibée chez les trois sous-populations monocytaires et la microglie à J7, avec ou sans CQ, avec un retour à J12 à un niveau d'expression similaire à celui de J0. La 12/15-LOX est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, l'hypertension, le diabète, les maladies neurodégénératives comme Alzheimer ou Parkinson, ou encore les pathologies infectieuses (522). En fonction des affections, la 12/15-LOX et ses métabolites (12(S)-HETE, 15(S)-HETE, résolvines et protectines) peuvent présenter des propriétés pro- ou anti-inflammatoires (537). En effet, la 12(S)-HETE et la 15(S)-HETE possèdent des effets pro-inflammatoires en participant au recrutement des leucocytes vers les sites inflammatoires et en contribuant à la production d'IL-6, TNFα, CCL2 et à l'expression de molécules d'adhésion par les macrophages et les cellules endothéliales (522, 538, 539). Ainsi, en condition inflammatoire, l'inhibition de la 12/15-LOX sur les macrophages diminue l'expression de l'IL-6, IL-12, CXCL9 et CXCL10 (540). D'un autre côté, les effets anti-inflammatoires de la 12(S)-HETE

et de la 15(S)-HETE ont été mis en évidence par la dissection de cerveaux suite à un accident vasculaire cérébral et seraient dépendants de PPARγ (541). Ainsi, *via* PPARγ, la 12/15-LOX participe à la surexpression de CD36 sur les monocytes et à la polarisation M2 des macrophages (522). Les lipoxines telles que LXA4, générée à partir du 15(S)-HETE, possèdent des propriétés pro-résolutives en diminuant par exemple le recrutement des neutrophiles sur les sites inflammatoires tout en permettant l'infiltration de monocytes phagocytaires aux propriétés anti-inflammatoires exprimant la 12/15-LOX et participant à l'élimination des cellules apoptotiques durant la phase de résolution de l'inflammation (522, 542). Ainsi, dans un modèle d'ECM basé sur des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA*, la surexpression de l'axe 12/15-LOX/LXA4 protège les souris du paludisme cérébral en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et l'IFNγ dans le cerveau (148). De plus, Souza *et al* ont montré dans ce même modèle que l'axe 12/15-LOX/LXA4 permettait de restaurer l'expression de HO-1, d'inhiber l'expression de ICAM-1 conduisant à une diminution de l'adhésion des GRi aux cellules endothéliales et de prévenir l'altération de la BHE (543). D'un autre côté, l'inhibition de la 12/15-LOX et de LXA4 conduit à l'exacerbation de l'inflammation dans un modèle murin d'arthrite (544). Dans le même sens, une faible expression d'*ALOX15* a été observée au cours d'un paludisme chez la femme enceinte (535). En inhibant le recrutement des LT et en limitant la production de TNFα et d'IFNγ, les résolvines et les protectines semblent également jouer un rôle favorable dans la résolution de la neuroinflammation (522). Frigerio *et al* ont montré dans un modèle murin d'épilepsie que la neuroinflammation observée serait due à un défaut dans la mise en place des mécanismes pro-résolutifs avec notamment une diminution de l'expression d'*ALOX15* et de l'expression des lipoxines qu'elle génère (545). Comme dans notre étude, l'expression de *ALOX15* augmente lors de la phase de résolution suggérant son importance dans l'évolution favorable des pathologies neuro-inflammatoires. Enfin, il a été montré que la 12/15-LOX pouvait bloquer la maturation des cellules dendritiques, inhibition dépendante de l'activation de Nrf2 (546). En conclusion, si l'expression de la 12/15-LOX semble favoriser la résolution de l'inflammation comme cela a été montré dans notre étude, une sur-activation de cette enzyme semble associée à un emballement des réponses pro-inflammatoires et oxydantes observées dans certaines pathologies. L'évaluation de son expression au cours du neuropaludisme chez l'homme pourrait contribuer à une meilleure compréhension de son rôle et des mécanismes mis en œuvre lors de la phase de résolution de la neuroinflammation.

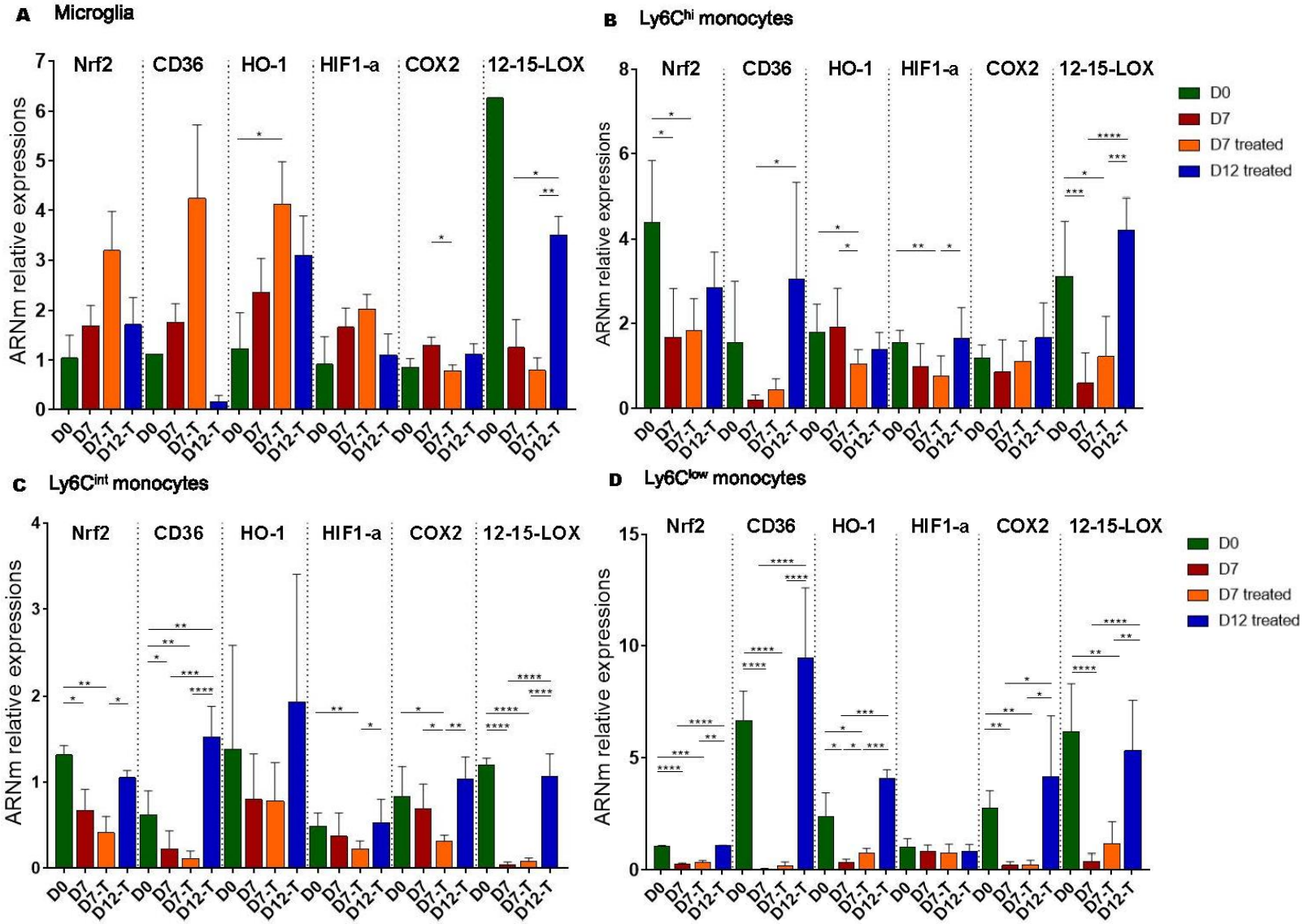


Figure 24 : Niveaux d'expression des gènes *Nrf2*, *CD36*, *HMOX1*, *HIF-1α*, *COX-2* et *ALOX15* par les sous-populations monocytaires dans le sang périphérique et par la microglie des souris infectées par *P. berghei ANKA* et traitées tardivement à la chloroquine (J7-T et J12-T). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

II-3.4) Dosage de cytokines dans les plasmas et cerveaux totaux

Pour compléter nos résultats, nous avons également déterminé les réponses cytokiniques mises en place dans notre modèle. Pour cela, nous avons dosé par LegendPlex^{TM} différentes cytokines et chimiokines produites à la fois dans le plasma et le cerveau des souris infectées et traitées ou non par la CQ. La figure 25 présente les concentrations de cytokines pro- et anti-inflammatoires : TNFα, IL-1β, IL-6 et IL-10 (A), de chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites inflammatoires : CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10 (B) et les chimiokines impliquées dans le recrutement des LTh2 et LT régulateurs (CCL17, CCL22) et des neutrophiles (CXCL1, CXCL5) (C) à la fois dans le plasma et le cerveau des souris au cours du neuropaludisme (J0 à J7) et de sa résolution (J7-T à J12). Ces résultats sont issus d'une seule expérimentation comprenant 3 à 5 souris par groupe (4 J0, 3 J7-NT, 5 J7-T) dont chaque échantillon a été analysé en duplicat. Ce faible nombre, pourrait expliquer la difficulté à obtenir des résultats significatifs. Nos interprétations, se basent sur des tendances qui devront être confirmées par de futures expérimentations.

De J0 à J7, on observe dans le plasma une tendance à une augmentation des concentrations des 4 cytokines pro- et anti-inflammatoires étudiées ainsi que des chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10). En parallèle, les concentrations de cytokines pro- et anti-inflammatoires, précédemment augmentées dans le plasma à J7, semblent diminuer dans le cerveau des souris de J0 à J7. Les quantités de chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites inflammatoires et notamment le cerveau, semblent quant à elles augmenter, bien qu'une diminution de concentration de CCL4 est également observée. Les quantités de chimiokines impliquées dans le recrutement des LTh2 et LT régulateurs et des neutrophiles semblent quant à elles stagner (CCL17), diminuer (CCL22, CXCL5) ou augmenter (CXCL1).

Le traitement tardif à la CQ permet de diminuer, à J7, les quantités de TNFα, d'IL-6 et d'IL-10 sans diminuer celles de l'IL-1β dans le plasma des souris. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, sauf pour l'IL-10 dont les concentrations ont souvent été décrites comme augmentées en présence de CQ (488, 490, 493–495, 512). En parallèle, et contrairement aux données plasmatiques, le traitement par la CQ conduit à une augmentation des concentrations des cytokines pro- et anti-inflammatoires (significatif pour l'Il-1β et l'IL-10) et une diminution de celles des chimiokines CCL2, CCL3, CXCL9 et CXCL10 dans le cerveau des souris. La CQ ne semble pas impacter la sécrétion de CCL4, CCL17, CCL22 et

CXCL1, mais conduit, en revanche, à une augmentation de la quantité de CXCL5 dans le cerveau de souris traitées.

De nombreux travaux confirment les résultats de notre étude indiquant une augmentation de la sécrétion périphérique de cytokines pro-inflammatoires lors d'une infection palustre chez l'homme et chez la souris, contribuant au contrôle de la parasitémie et à l'élimination de *Plasmodium* (100, 138). En revanche, leur surproduction conduit à l'exacerbation de la neuroinflammation et aggrave la pathogénicité palustre (120, 150, 152–155, 186, 458, 520). De façon surprenante, nous avons montré que les concentrations de cytokines évoluaient de manière opposée dans le plasma et le cerveau des souris infectées avec une diminution des quantités de cytokines dans le cerveau des souris lors du neuropaludisme. Ces résultats renforcent l'hypothèse de Zak *et al* selon laquelle les marqueurs analysés dans la circulation périphérique, notamment la production de cytokines par les cellules immunitaires, ne sont pas nécessairement représentatifs des phénomènes mis en œuvre dans les organes profonds et, dans notre cas, de ce qu'il se passe dans le cerveau des souris lors d'un ECM (487). Cela pourrait également expliquer les résultats divergents obtenus par différents travaux de recherche, en fonction des protocoles mis en place et la localisation des marqueurs étudiés. Cette hypothèse met également en doute la pertinence de l'extrapolation des résultats murins cérébraux à l'homme et la nécessité de mettre en place des études cliniques chez l'homme. En revanche et contrairement à nos résultats, l'équipe de Medana *et al* ont observé de fortes concentrations de TNFα dans le cerveau des souris présentant un ECM, associées à une accumulation des LT cytotoxiques et à l'altération de la BHE (156). Cette divergence pourrait s'expliquer par un choix différent de souris de fonds génétiques différents (CBA versus C57BL/6) et par les techniques différentes de préparation du cerveau employées en vue de doser les marqueurs. Nos résultats traduisent également une augmentation des chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites inflammatoires, à la fois dans le plasma et le cerveau des souris, et principalement de CXCL9 et CXCL10. Les données de la littérature confirment nos résultats et mettent en évidence le rôle majeur de ces chimiokines dans l'aggravation du neuropaludisme (118, 329–331, 334). Notre étude montre également une augmentation des concentrations de CXCL1 et une diminution de CXCL5 dans le plasma et le cerveau des souris lors du neuropaludisme. Enfin, nous observons dans notre modèle, une diminution de la concentration de CCL22 et aucune évolution de CCL17 simultanément dans le plasma et le cerveau des souris au cours d'un ECM. Ces résultats n'ont à ce jour pas encore été décrit dans la littérature. Ces deux chimiokines partagent le même récepteur (CCR4), mais il semblerait que CCL22 prennent le dessus sur CCL17 en induisant

plus efficacement l'internalisation de CCR4 conduisant à la mise en place des fonctions chimiotactiques qui en découlent (attraction des LTh2 et LT régulateurs vers les sites inflammatoires) (547, 548). La diminution de CCL22 à la fois dans le plasma et le cerveau des souris suggère donc un défaut dans les réponses lymphocytaires Th2 et T régulatrices lors du neuropaludisme. Le rôle de ces réponses régulatrices dans le cadre d'un neuropaludisme reste encore flou. Si dans certaines études, elles semblent nécessaires au contrôle l'infection et de l'inflammation (549, 550), d'autres évoquent un rôle plus délétère empêchant la mise en place, à la fois des réponses pro-inflammatoires précoces indispensables à la résolution, mais également des mécanismes conduisant au développement de la mémoire lymphocytaire (551).

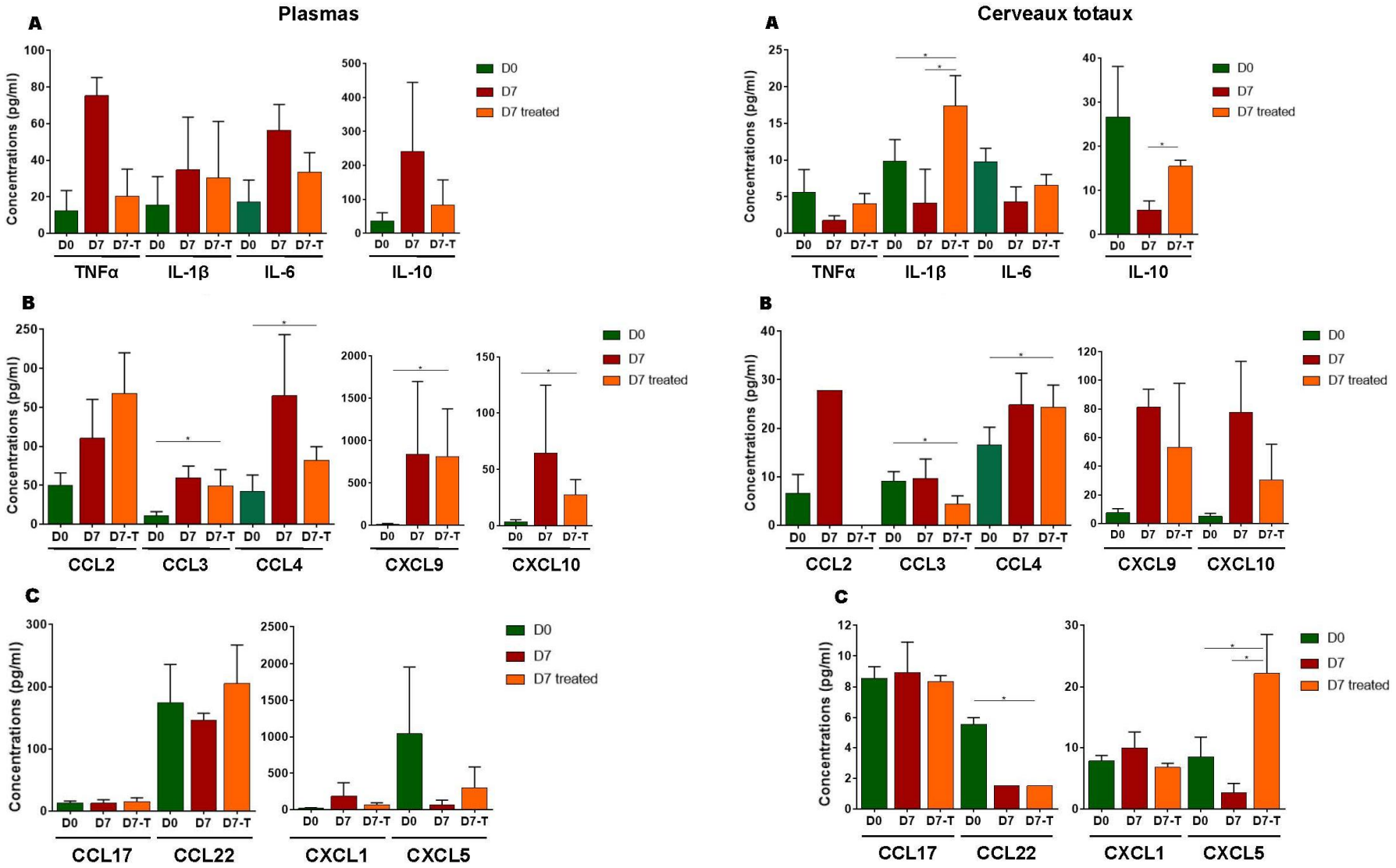


Figure 25 : Concentrations de différentes cytokines pro/anti-inflammatoires (A) et chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites d'inflammation (B) et dans le recrutement des LTh2, LT régulateurs et neutrophiles (C) à la fois dans le plasma (à gauche) et les cerveaux (à droite) de souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* et traitées ou non par la chloroquine (J0, J7 non traitées et J7 traitées). *p<0,05

II-4. Conclusion

En conclusion, cette étude menée sur un modèle murin d'ECM basé sur des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* et traitées ou non tardivement par la CQ nous a permis de mieux identifier les mécanismes immunitaires développés au cours de la cinétique d'infection palustre (J0-J3-J5-J7) et de sa résolution (J7-J8-J12-T) à la fois dans la circulation périphérique, la rate et le cerveau des souris.

La figure 26 propose une synthèse des résultats majeurs obtenus. En ce qui concerne la cinétique des pourcentages de sous-populations, nos résultats suggèrent pour les monocytes dans le sang et la rate, un rôle dans la résolution des monocytes Ly6C^{low} en particulier à J7. Dans la rate, le phénotype des Ly6C^{hi}, décrits dans la littérature comme impliqués dans la neuroinflammation, est particulièrement intéressant à J5, date d'initiation des symptômes neurologiques, puisqu'un pic de leur pourcentage est observé. Au niveau du cerveau, nos résultats suggèrent une implication délétère de la microglie et des monocytes Ly6C^{int} à J7, contrebalancée par une implication positive à J7 des Ly6C^{low} et à J8 des Ly6C^{hi}. A J12, les résultats suggèrent un rôle positif des monocytes Ly6C^{low} dans le sang et la rate, alors que les monocytes Ly6C^{int} infiltrés dans le cerveau, ainsi que la microglie, joueraient à leur tour un rôle favorable.

Concernant les phénotypes de ces populations d'après les marqueurs étudiés, on peut souligner une absence néfaste de l'expression du récepteur CD36 à J5 dans la rate sur les monocytes Ly6C^{hi}, ainsi qu'à J7 dans le cerveau sur les monocytes Ly6C^{int} et la microglie. Cependant, son expression semble moins importante dans le sang puisque son faible niveau d'expression accompagne tout de même le rôle favorable des monocytes Ly6C^{low} à J7.Ainsi, le rôle de CD36 pourrait être utile dans la rate et le cerveau à l'apparition des symptômes neurologiques, puis dans une phase de résolution plus tardive dans le sang. Le récepteur CD163 se comporte très différemment de CD36. En effet, on observe un rôle plutôt défavorable à J5 et J7 dans la rate et le cerveau (monocytes Ly6C^{int} et microglie), puis une expression associée à la résolution sur les monocytes Ly6C^{low} sanguins. Pour CMH-II, une expression précoce dès l'initiation des symptômes neurologiques (J5 dans notre modèle) semble néfaste dans la rate avec les monocytes Ly6C^{hi}. Son absence d'expression à J7 dans le cerveau sur les monocytes Ly6C^{int} et la microglie est en revanche associée à des phénotypes défavorables. Cependant, sa surexpression à J7 en présence de CQ peut être due au traitement dans notre modèle. Dans la rate, son expression sur les monocytes Ly6C^{low} correspond à la

phase de résolution, suggérant une phase tardive nécessaire à la mise en place d'une activation de la réponse humorale.

L'étude des niveaux d'expression de gènes a permis de mettre en évidence une inhibition très nette de l'expression de *Nrf2*, *CD36*, *HMOX1*, *COX-2* et d'*ALOX15* par les monocytes $Ly6C^{low}$ sanguins à la phase symptomatique (J7). Leur niveau d'expression basal était retrouvé à la phase de résolution (J12) suggérant un rôle de ces gènes au cours de cette phase résolutive. Dans le cerveau, le phénotype plutôt défavorable de la microglie à J7 était surtout associé à une expression moindre d'*ALOX15* dont le niveau d'expression initial était retrouvé à la phase de résolution (J12), suggérant un rôle important de cette voie d'activation dans le cerveau.

Malgré les limites de notre modèle, en particulier l'usage d'un antipaludique immunomodulateur, notre étude rend compte de la complexité des mécanismes immunitaires mis en place lors d'un ECM. En fonction de la cinétique d'infection et des organes observés, les réponses immunitaires peuvent considérablement varier. Ces résultats permettent de formuler des hypothèses qui pourront être explorées sur des patients atteints de neuropaludisme. Cette perspective de recherche constitue la troisième partie de mes résultats, au travers du projet NEUROCM impliquant le recrutement d'une nouvelle cohorte de patients.

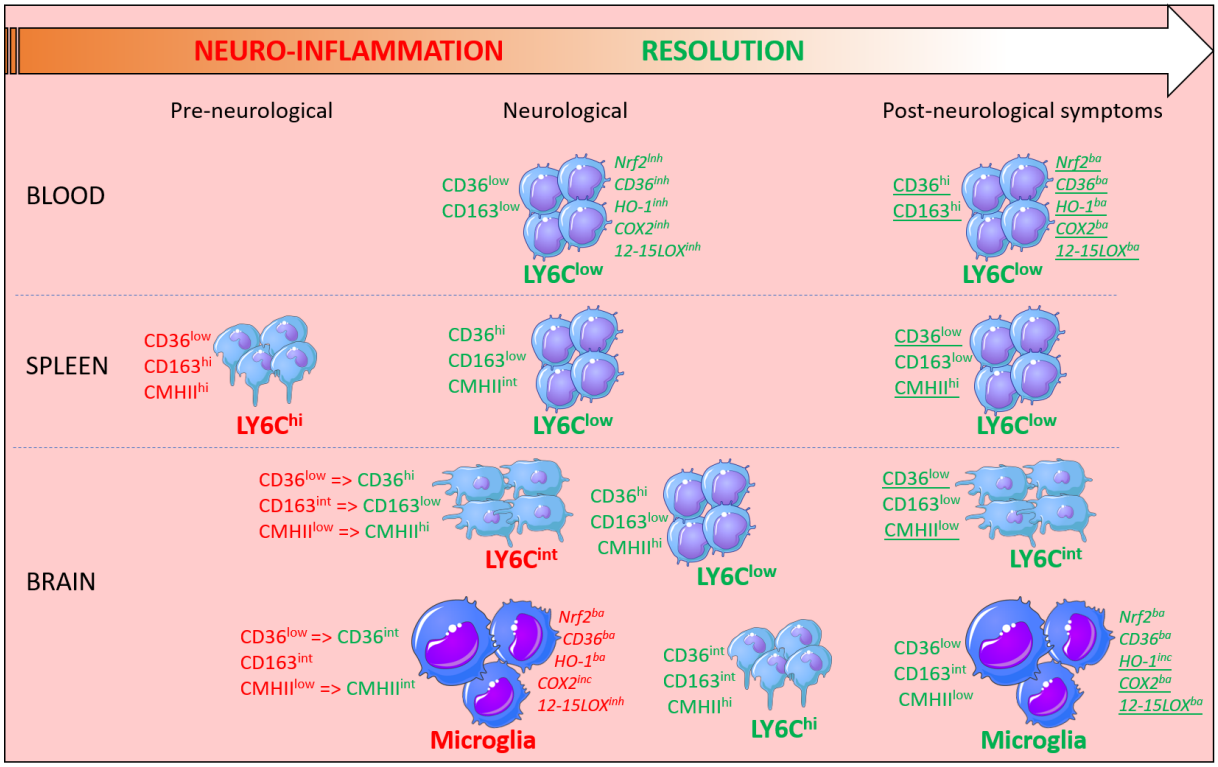


Figure 26 : Schéma récapitulatif des principaux résultats obtenus au cours de la cinétique d'infection dans un modèle murin de paludisme cérébral et de sa résolution par un traitement tardif à la chloroquine, dans le sang, la rate et le cerveau des souris. A gauche des monocytes sont notés les niveaux d'expression des protéines (hi, int, low), à droite, les niveaux d'expression des gènes (ba, inc, inh). Les données en rouge représentent les phénotypes associés à la neuroinflammation, en vert ceux associés à la résolution liée au traitement à la CQ. Les phénotypes d'une même population cellulaire ayant évolué au cours de l'infection sont soulignés. Hi = high (forte expression), int = intermediate (expression intermédiaire), low (expression faible), ba = basal (niveau d'expression basal), inc = increased (niveau d'expression augmenté par rapport au niveau basal), inh = inhibited (niveau d'expression inhibé par rapport au niveau basal).

III – Etude NEUROCM chez des patients présentant un paludisme simple ou un neuropaludisme (2018)

III-1. Introduction

L'étude NEUROCM est un projet mené par mon laboratoire Pharma-Dev (UMR 152, Toulouse) en collaboration avec 3 autres équipes : le CERPAGE (Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance, Cotonou, Bénin), MERIT (Mère et Enfant face aux Infections Tropicales, UMR 216, Paris), et NET (Neuroépidémiologie Tropicale, UMR 1094, Limoges). Cette étude vise à identifier les facteurs de l'hôte et du parasite à l'origine de la neuroinflammation et de sa résolution dans un contexte de paludisme cérébral. Pour ce faire, un recrutement d'enfants atteints de paludisme non compliqué (UM, « uncomplicated malaria ») et de neuropaludisme (CM, « cerebral maalria ») a été mis en place au Bénin en 2018.

Ce projet est structuré autour de 4 axes ou Work Packages (WP). Le WP1 « Recrutement et suivi de la cohorte » a permis le recrutement des enfants béninois et leur inclusion dans le groupe UM ou CM en fonction de critères clinico-biologiques analysés lors de leur admission dans les centres de santé. Il inclut également un suivi des patients à J3 et J21 post-inclusion afin d'avoir un suivi clinique et biologique des enfants jusqu'à la guérison. Le WP2 « Facteurs parasitaires à l'origine de la neuroinflammation et de sa résolution dans le cadre d'un paludisme cérébral » s'intéresse à caractériser le polymorphisme génétique de *P. falciparum* et à identifier puis valider le rôle de certaines protéines parasitaires associées au neuropaludisme. Cet axe est porté par le laboratoire MERIT à Paris. Le WP3 « Facteurs de l'hôte à l'origine de la neuroinflammation et de sa résolution dans un contexte de paludisme cérébral », dans lequel j'interviens, a pour but de compléter les résultats précédemment acquis sur la réponse monocytaire au cours du neuropaludisme (cohorte 2014-2016) et dans le modèle souris. Les données socio-démographiques et clinico-biologiques des patients seront également corrélées aux analyses immunologiques (caractérisation des populations monocytaires et des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes). Enfin, le WP4 « Exploitation des résultats et synthèse stratégique pour l'amélioration de la gestion du neuropaludisme », était dédié à la mise en place d'une base de données commune et sécurisée

rassemblant toutes les données de l'étude et à apporter un support dans l'analyse des résultats des WP1, 2 et 3.

Aujourd'hui, dans les pays endémiques, le diagnostic du neuropaludisme est toujours difficile. Un coma en présence de parasites de *P. falciparum* dans le sang périphérique est souvent considéré comme un paludisme cérébral conduisant à une surestimation d'environ 25% des cas de neuropaludisme (552). Ce projet fournit pour la première fois un diagnostic différentiel précis du neuropaludisme en mettant en place un examen fundoscopique (553) et en effectuant une analyse biochimique sanguine étendue associée à un diagnostic moléculaire des infections microbiennes dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients. De plus, la guérison du neuropaludisme repose sur deux aspects : l'élimination du parasite et la résolution de la neuroinflammation. Le projet NEUROCM étudie ces deux aspects en identifiant les caractéristiques parasitologiques et immunitaires à l'origine de la neuroinflammation lors d'un paludisme cérébral puis en les corrélant aux données socio-démographiques et clinico-biologiques des patients. Dans la suite de ce document, je m'attacherai plus particulièrement à disséquer les cibles cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire de l'hôte au cours de l'inflammation et de sa résolution dans le sang périphérique (plasma, PBMC) et les urines des patients. Une meilleure compréhension de ces mécanismes permettra d'aider à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces contre l'infection palustre et particulièrement le neuropaludisme.

III-2. Matériels et méthodes

Une partie de cette section concernant principalement le protocole de l'étude, l'inclusion des patients (WP1) ainsi que des premiers prélèvements et analyses du WP2 a déjà été publiée à la suite de la campagne de recrutement (7) (voire Annexe 1). Je m'attacherai ici à développer la méthodologie mise en place dans le WP1 et WP3 concernant les modalités de recrutement des enfants dans l'étude, les prélèvements biologiques et l'ensemble des analyses immunologiques qui en découlent. La méthode développée dans le WP2 ne sera pas abordée.

Ethique

L'approbation éthique de ce projet a été obtenue auprès du Comité National d'Ethique pour la Recherche en Santé au Bénin (n°67/MS/DC/SGM/DRFMT/CNERS/SA, 10/17/2017) et par le Comité consultatif de déontologie et d'éthique de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD, 24/10/2017).

Population et sites de l'étude

Cette étude a été menée en 2018 sur une cohorte d'enfants béninois atteints de deux formes cliniques de paludisme : le paludisme non compliqué (UM) et le neuropaludisme (CM). Ainsi, les cas CM ont été inclus de mars à novembre 2018, dans deux hôpitaux de référence, le CHU-Mère et Enfant de la Lagune à Cotonou et l'Hôpital de zone d'Abomey Calavi, et les cas UM de mai à septembre 2018, dans un dispensaire du district de Sô-Ava (zone sanitaire d'Abomey Calavi). Deux médecins cliniciens et un infirmier, préalablement formés à l'évaluation clinique des enfants CM et UM, ont été recrutés et dédiés à l'étude respectivement dans les deux centres hospitaliers et au dispensaire de Sô-Ava. L'inclusion des patients s'est déroulée en collaboration avec l'équipe soignante des centres et n'a pas interféré avec leur fonctionnement habituel. Les soins prodigués aux patients inclus ont été effectués selon les pratiques habituelles de prise en charge du paludisme simple et du paludisme cérébral des trois centres.

Inclusion des patients

** Informations et consentement*

L'objectif de cette étude était l'inclusion et le suivi de 100 enfants âgés de 2 à 5 ans dans chacun des deux groupes cliniques (UM et CM). Pour tous les enfants, le premier critère d'inclusion était l'acceptation par les parents (ou tuteurs) de la participation de leur enfants à l'étude. Ainsi, une information claire et adaptée a été délivrée aux parents par les médecins cliniciens ou l'infirmier en charge de l'étude dans chaque centre, suivi de la signature d'un formulaire de consentement.

** Critères d'inclusion et d'exclusion*

L'inclusion des patients UM a été définie en prenant en compte les caractéristiques suivantes : 1/ un âge compris entre 24 et 71 mois, 2/ une fièvre > 38°C à l'inclusion ou dans les 24h précédant l'inclusion, 3/ l'absence de signe clinique et biologique de paludisme grave (voir Partie 1, I-4.2), de signe de danger et d'autre cause évidente de fièvre, et 4/ une parasitémie à *P. falciparum* comprise entre 1000 et 500 000 parasites/µL. Le diagnostic des patients CM a été défini par : 1/ un âge compris entre 24 et 71 mois, 2/ une goutte épaisse positive à *P. falciparum*, 3/ un score de Blantyre ≤ 2 et 4/ un test négatif pour le VIH.

Ont été exclus de l'étude les enfants présentant un TDR positif pour le VIH, une méningite avérée ou suspectée (leucocytes > 1000/µL et/ou présence de bactéries dans le LCR des patients et/ou PCR positive pour toutes bactéries, virus, ou levures identifiées dans le LCR

des patients), une maladie neurologique préexistante ou encore un coma traumatique ou toxique.

** eCRF, Examens cliniques et biologiques*

Suite au consentement des parents, un questionnaire électronique ou eCRF (electronic Case Report Form) a été rempli avec l'aide des parents. L'eCRF rassemble, entre autres, les informations socio-démographiques, les antécédents cliniques et les caractéristiques cliniques du patient lors de son admission dans le centre de santé ou l'hôpital. Il a été complété tout au long de la prise en charge de l'enfant et lors de son suivi jusqu'à J21, par les données clinico-biologiques et toute autre information concernant les traitements administrés et le devenir clinique du patient. La confidentialité du patient a été assurée par un codage anonyme mis en place dès l'inclusion de l'enfant. Une fois le consentement obtenu, deux TDR pour *P. falciparum* et pour le VIH ont été immédiatement effectués afin de confirmer une infection palustre et exclure les infections par le VIH. Un examen clinique de J0 a ensuite été réalisé (poids, température, score de Blantyre, fréquences respiratoire et cardiaque, hépato-splénomégalie, critères cliniques de gravité,…), ainsi qu'un bilan biologique comprenant un frottis sanguin et goutte épaisse, une numération formule sanguine (Sysmex KX-21N, Sysmex XT-1800i et ABS Micro ES 60), une analyse biochimique (Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{++}, HCO_3^-, albumine, urée, créatinine, glucose, lactate - Piccolo Sysmex) et une analyse bactériologique (hémoculture, Gram). Un prélèvement du LCR a également été effectué afin de déterminer la présence d'une méningite ou encéphalopathie, validée par l'identification de 14 pathogènes (bactéries, virus, levure) les plus couramment responsables de ces pathologies (*E. coli K1*, *H. influenzae*, *L. monocytogenes*, N. meningitidis, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, cytomégalovirus, entérovirus, virus de l'herpès simplex 1 et 2, virus de l'herpès humain 6, parechovirus humain, virus de la varicelle-zone, *Cryptococcus neoformans/gattii*) grâce au panel Méningite / Encéphalite FilmArray® (Biomérieux). Cette recherche de pathogène avait pour but de renseigner l'étiologie des comas de l'enfant et d'écarter les comas non palustres dus à un autre pathogène. Enfin, un examen fundoscopique (Eyepax 1.0 Dioptrix) a été réalisé pour les enfants CM à J1 afin d'identifier les rétinopathies généralement observées lors d'un neuropaludisme et dont la sévérité traduit les séquelles neurologiques. Les images des fonds d'œil ont été saisies et téléchargées dans l'eCRF.

** Prélèvements et constitution d'une banque d'échantillons*

Deux prélèvements sanguins de 2 mL en tube héparinés et EDTA ont été réalisés respectivement pour les analyses biochimiques, ainsi que pour la NFS et la goutte

épaisse/frottis sanguin. Puis, un prélèvement sanguin de 5 mL a été réalisé pour l'hémoculture ainsi que 6 mL en tube EDTA pour la recherche des facteurs parasitaires et immunitaires de l'hôte. Une ponction lombaire (1mL de LCR) a été effectuée sur les patients CM ne présentant pas de contre-indication (instabilité clinique, altération profonde de l'état général). Enfin, 30 à 50mL d'urines ont été récupérées pour des analyses ultérieures chez les patients UM et CM. Les échantillons de chaque patient ont été identifiés par un numéro de laboratoire et anonymisés.

Les analyses de laboratoire de routine, à l'exception de la bactériologie ont été effectuées dans les hôpitaux pour les patients CM et au laboratoire CERPAGE pour les UM. La bactériologie a été menée au laboratoire de microbiologie du CNHU (Centre National Hospitalier Universitaire, Cotonou). Le traitement des échantillons de recherche ont été effectués rapidement au laboratoire CERPAGE après leur prélèvement. Le plasma a été séparé du sang total par centrifugation et conservé à -80°C. Les PBMC ont été isolées du culot globulaire par centrifugation en gradient de densité Lymphoprep®. L'anneau de PBMC a été récupéré et les cellules lavées en $DPBS^{-/-}$. Les PBMC ont ensuite été congelées en RPMI complémenté par 30% de SVF (Sérum de Veau Fœtal, Sigma) et 30% de DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma) une nuit à -80°C avant d'être placées dans l'azote liquide. Enfin, les urines ont été stockées à -80°C. A la fin du recrutement, les plasmas et PBMC ont été rapatriés en France (Toulouse), tout comme le LCR (Paris). Les urines sont en revanche restées au laboratoire CERPAGE à Cotonou.

** Suivi des patients*

Chez les enfants du groupe CM, une étude de la cinétique de l'infection et de sa résolution a été mise en place afin de décrire les évènements immunitaires, inflammatoires et résolutifs mis en œuvre. Pour cela, les données cliniques et les échantillons sanguins et urinaires ont été recueillis à J3 et J21 à l'hôpital. Le point J3 permet d'avoir des données concernant l'efficacité du traitement et les réponses immunitaires rapidement mises en œuvre pour résoudre la neuroinflammation. Le point J21 sert de point contrôle. En effet, on estime qu'à ce stade, les enfants devraient avoir retrouvés des réponses immunitaires physiologiques. Pour ces deux points de cinétique, des prélèvements sanguin (tube EDTA 6ml) et urinaire (30 à 50mL) ont été effectués. Afin de limiter les perdus de vue, les parents/tuteurs ont été contactés quelques jours avant J21 pour leur rappeler la visite de suivi. Aucun suivi n'a été mis en place pour les patients UM.

Gestion des données

Les données socio-démographiques et clinico-biologiques issues de l'eCRF ont été collectées en temps réel et en flux continu au fur et à mesure de l'avancée du projet à l'aide de l'application web CSOnline-Ennov Clinical (https://ufrcb.chu-limoges.fr/crfonline/) gérée par une plateforme spécialisée (CEBIMER) rattachée au laboratoire NET (Limoges). La saisie et la validation de l'ensemble de ces résultats ont été respectivement effectuées par les médecins cliniciens et l'infirmier chargés de l'étude, permettant d'obtenir une base de données en ligne, sécurisée, unique et partagée entre l'ensemble des membres du projet en temps réel. Un comité scientifique indépendant ou DSMB (Data Safty Monitoring Board), formé par deux médecins spécialistes et d'un statisticien, a été constitué afin de bénéficier d'un comité d'experts extérieur au projet pour recadrer les inclusions en cas de problème d'effectif, et d'aider à la classification finale des patients dans l'étude. En effet, l'attribution d'un groupe définitif pour certains patients a été parfois délicate et ambiguë dès l'admission de l'enfant, et dans d'autres cas à l'arrivée des résultats de PCR à partir du LCR. Les résultats parasitologiques et immunologiques issus des WP2 et WP3 ont été remplis au fur et à mesure des analyses par les personnes référentes de ces WP.

Dosages urinaires de différents marqueurs des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes par EIA

Les dosages urinaires ont été réalisés au laboratoire CERPAGE au cours d'une mission de quelques semaines que j'ai effectué au Bénin en novembre/décembre 2018. Les concentrations urinaires du 15-isoprostane F_{2t}, LTB4, LXA4 (Oxford Biomedical Research), ainsi que des métabolites de la PGE2 (Cayman) et les quantités de glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG), ont été mesurées dans les urines des patients UM et CM à J0 puis à J3 et J21 pour les CM. Ces concentrations ont été ensuite normalisées par le dosage de la créatinine urinaire (BioVision), produit de la dégradation de la créatine éliminé dans les urines. Sa quantité mesurée dépend de la dilution de l'urine et en fait donc un marqueur de choix pour normaliser les concentrations des autres marqueurs. Les protocoles de dosage ont été effectués en suivant les recommandations des fournisseurs des kits EIA. Pour la mesure des concentrations d'isoprostane, les échantillons ont été prétraités par de la β-glucuronidase afin de limiter sa métabolisation en acide glucuronique. De même, pour des raisons d'instabilité de la PEG2, les échantillons ont subi une dérivation permettant de doser un métabolite stable de la PGE2 issu de la conversion de la 13,14-dihydro-15-kéto PGA2 et de la 13,14-dihydro-15-kéto PGE2, deux autres métabolites, également instables, de la PGE2. Pour la mesure du

glutathion oxydé (GSSG), les échantillons ont été prétraités au 2-vinylpyridine, utilisé pour bloquer le GSH libre et les autres thiols présents dans l'échantillon. Un second dosage en absence de traitement a permis de déterminer la concentration de GSH totale. La quantité de glutathion réduit (GSH) a été calculée en soustrayant les concentrations de GSSG à celles du GSH total.

Dosage des niveaux plasmatiques des cytokines, chimiokines et autres marqueurs des réponses pro- et anti-inflammatoires

Les niveaux plasmatiques de 17 marqueurs des réponses pro- et anti-inflammatoires ont été dosés par la technologie Luminex^{TM} (Human Premixed Multi-Analyte Kit, LXSAHM-17, R&D Systems) avec l'aide la plateforme Anexplo (Genotoul, Toulouse). Le protocole a été effectué suivant les recommandations du fabricant. Brièvement, les échantillons et les standards ont été incubés avec des microparticules (billes de polystyrène) préalablement marquées par des anticorps ciblant les marqueurs d'intérêt. Un dispositif magnétique permet d'éliminer le surnageant sans perdre les microparticules et les analytes qui se sont liés à leur anticorps. Un cocktail d'anticorps biotinylés a ensuite été ajouté dans chaque puits suivi d'un lavage magnétique et de l'ajout de Streptavidine-phycoérythine (PE). Des lavages magnétiques finaux ont permis d'éliminer tout ce qui ce s'est pas lié au fluorophore avant la remise en suspension des microparticules et la lecture par un analyseur adapté (LX-100, Luminex Corporation). Dans ce dernier, un aimant capture et maintient les microparticules alors que deux lasers (LED) les excitent avant de mesurer les longueurs d'onde émises. Cette technique, fondée sur le principe de la cytométrie en flux, nous a ainsi permis de doser simultanément et dans un même échantillon les concentrations des marqueurs suivants : TNFα, Il-1β, Il-6, Il-8, IL-10, IL-12, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10, CCL17, CCL22, CXCL5, ICAM-1, Granzyme B, et Angiopoïétine-2. Ces derniers correspondent à ceux dosés préalablement dans notre modèle murin de paludisme cérébral et dont les résultats ont déjà été discutés (voir partie II-3.4). Tous les échantillons pour lesquels le logiciel d'analyse pouvait donner une concentration exacte ou extrapolée (lorsque cette dernière était très proche de la courbe standard) ont été gardés. Les points trop éloignés de la gamme étalon ont été éliminés de l'analyse finale. La concentration plasmatique d'EPCR a été déterminée par ELISA selon les recommandations du fabricant (DuoSet® R&D Systems). Là aussi, seuls les points situés dans la courbe standard ont été gardés pour l'analyse finale.

Analyse des populations monocytaires issues des PBMC des patients UM et CM

L'analyse en cytométrie en flux n'a pas porté sur l'ensemble des échantillons. Etant donné que 23 patients CM sont décédés, nous avons constitué des sous-groupes de 23 échantillons pour les catégories suivantes : 1/ UM J0, 2/ CM J0 Survie, 3/ CM J0 Décès, 4/ CM J3, 5/CM J21. Les échantillons du groupe CM J0 Survie ont été sélectionnés et ajustés selon l'âge, le sexe, la durée de la fièvre et la durée du coma des patients du groupe CM J0 Décès. Afin d'avoir des informations fiables sur la cinétique de la résolution palustre, les 23 mêmes patients ont été sélectionnés et suivis dans les groupes CM J0 Survie, CM J3 et CM J21. Les échantillons du groupe UM ont été ajustés selon l'âge et le sexe des enfants. Dans chacun des 5 groupes, les PBMC ont été préparées et comptées avant d'être divisées et utilisées dans plusieurs protocoles réalisés simultanément le même jour : 1/ Protocole cytométrie : caractérisation des sous-populations monocytaires par cytométrie en flux, 2/ Protocole de tri cellulaire : séparation des trois sous-populations monocytaires en vue d'une analyse génique par RT-qPCR et 3/ Protocole d'analyse de ROS : évaluation de la production basale et induite de ROS par les monocytes.

** Préparation des PBMC et comptage des cellules*

Les PBMC congelées dans l'azote liquide et rapatriées à Toulouse ont été décongelées au bain-marie (37°C) puis lavées avec du $DPBS^{-/-}$ et centrifugées (10min, 1000 rpm). Après avoir retiré le surnageant et afin d'éliminer tout trace de globule rouge, la suspension cellulaire a été traitée par 500µl d'ACK (2min à 37°C) avant d'être lavée avec du $DPBS^{-/-}$ et centrifugée (10min, 1000 rpm). Une fois le surnageant aspiré, 1mL de milieu de culture constitué de SFM (Serum-free medium, Sigma) + 1% L-glutamine + 1% penicilline/streptovidine + 10% SVF (Sigma) a été ajouté au culot cellulaire. Les cellules ont été comptées à l'aide d'un compteur automatisé de cellules (Countess™ II, ThermoFisher) puis séparées selon les 3 protocoles différents.

** Protocole cytométrie en flux: caractérisation des sous-populations monocytaires*

A la suite du comptage, un minimum de 500 000 PBMC a été distribué dans des tubes de cytométrie et marqué avec différents anticorps couplés à des fluorochromes selon les recommandations du fournisseur (Tableau 10). Un marqueur de viabilité a été ajouté afin de discriminer les cellules vivantes des mortes (Live-dead). Un amplificateur de signal (tandem signal enhancer, Miltenyi) a été utilisé pour augmenter la spécificité de nos marquages et limiter les bruits de fond. Un tube de cellules non marquées, des monomarquages sur billes et sur cellules ainsi que des contrôles isotypiques ont été effectués afin de renforcer la fiabilité

des résultats. L'analyse des échantillons par cytométrie en flux a été menée sur un cytomètre LSR Fortessa (BD Bio-Sciences) immédiatement après les marquages et sans fixation des cellules. Comme dans notre modèle murin d'ECM, après exclusion des doublets et sélection des cellules vivantes, les pourcentages des 3 sous-populations monocytaires ainsi que les intensités de fluorescence des anticorps testés ont été déterminés pour les 5 groupes de patients (UM J0, CM J0 Survie et Décès, CM J3, CM J21). Pour chaque échantillon, l'intégralité des cellules a été enregistrée afin de maximiser le nombre de monocytes présents dans chaque sous-population. L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo™, les échantillons présentant un nombre trop faible de monocytes dans chaque sous-population (arbitrairement fixé à 100 monocytes /sous-population) ont été retirés de l'analyse finale.

Tableau 10 : Marqueurs analysés sur les PBMC issus du sang périphérique des patients NEUROCM par cytométrie en flux

ANTICORPS	FLUOROCHROME	FOURNISSEUR	EXPERIMENTATIONS
LIVE-DEAD	Viobility 405/520 Fixable Dye	Miltenyi	Cytométrie, Tri cellulaire
CD14	FITC	Miltenyi	Cytométrie, Tri cellulaire
CD16	APC-Vio770	Miltenyi	Cytométrie, Tri cellulaire
HLA-DR	VioBlue	Miltenyi	Cytométrie, Tri cellulaire
CCR2	PE-Vio770	Miltenyi	Cytométrie
CX3CR1	PE	Miltenyi	Cytométrie
CD36	PerCP-Vio700	Miltenyi	Cytométrie
CD163	PE-Vio615	Miltenyi	Cytométrie

** Protocole tri : séparation des trois sous-populations monocytaires*

En parallèle de la cytométrie en flux et pour chaque échantillon, un minimum de 1,5 million de PBMC a été distribué en vue d'effectuer un tri cellulaire. Les PBMC ont été marquées par 3 anticorps (CD14, CD16, HLA-DR) permettant la discrimination des 3 sous-populations monocytaires chez l'homme (5). Le protocole de marquage, identique à celui effectué pour la cytométrie en flux mais ajusté au nombre de cellules présentes, a été effectué en respectant les recommandations du fournisseur (Tableau 10). Un marqueur de viabilité a été ajouté afin de discriminer les cellules vivantes des mortes. Le tri cellulaire a été mené sur un Influx™ (BD Bio-Sciences) immédiatement après le marquage des cellules. Après exclusion les doublets et sélection des cellules vivantes, les 3 sous-populations monocytaires présentes dans le sang des patients UM (J0) et CM (J0 Survie/Décès, J3, J21) ont été physiquement séparées et récupérées dans 3 eppendorfs distincts, comme cela a été fait précédemment dans notre

modèle murin d'ECM. Pour chaque échantillon, l'intégralité des cellules a été triée afin de maximiser le nombre de monocytes récupérés dans chaque sous-population.

** Expression génique de marqueurs pro- et anti-inflammatoires par les sous-populations monocytaires par RT-qPCR*

A la suite du tri cellulaire, du tampon de lyse a immédiatement été ajouté sur les cellules monocytaires et leurs ARNm ont été extraits selon le protocole d'extraction du fournisseur (ReliaPrep^{TM} RND Cell Miniprep System, Promega). Le traitement de nos échantillons à la DNAse a permis de supprimer les potentielles contaminations par de l'ADN génomique. La synthèse d'ADNc a été effectuée en suivant les recommandations du fournisseur (kit Verso^{TM}, Invitrogen). Différents gènes impliqués dans les réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes ont été amplifiés et analysés par RT-qPCR sur un LightCycler 480 en utilisant du SYBR Green I Master Mix (Roche) : *Nrf2*, *PPARγ*, *HMOX1*, *CD36*, *CD163*, *HIF1α*, *NOX2*, *NCF1* (gène de la p47phox), *COX_2*, *ALOX5*, *ALOX12* et *ALOX15* (gènes codant respectivement pour la 5-LOX, 12-LOX, et 15-LOX). Les séquences des amorces de ces gènes (Eurogentec) ont été conçues à l'aide du logiciel Primer3 (Tableau 11). Ces gènes reprennent en partie ceux déjà analysés précédemment dans notre modèle murin d'ECM. La GAPDH a été utilisée comme gène de ménage. Une quantification relative des niveaux d'expression des gènes étudiés a été réalisée à l'aide d'une gamme de concentrations réalisée sur le pool d'échantillons testés. La pente, l'efficacité, l'erreur ainsi que les valeurs des Ct et des Tm ont été contrôlées afin de valider les résultats obtenus. Les amplifications avec des valeurs d'efficacité inférieures à 1,7 et supérieures à 2,3 n'ont pas été analysées.

Tableau 11 : Séquences d'amorces humaines utilisées en RT-qPCR sur les échantillons NEUROCM, 2018

GENES	SENS	ANTISENS
GAPDH	5'-AGG-TCG-GAG-TCA-ACG-GAT-TT	5'-ATC-TCG-CTC-CTG-GAA-GAT-GG
NRF2	5'-GCG-ACG-GAA-AGA-GTA-TGA-GC	5'-GTT-GGC-AGA-TCC-ACT-GGT-TT
PPARγ	5'-GCT-GTG-CAG-GAG-ATC-ACA-GA	5'-GGG-CTC-CAT-AAA-GTC-ACC-AA
HMOX1	5'-TCC-GAT-GGG-TCC-TTA-CAC-TC	5'-CAA-GGA-AGC-CAG-CCA-AGA-GA
CD36	5'-GGT-GTG-GTG-ATG-TTT-GTT-GC	5'-CAG-GGC-CTA-GGA-TTT-GTT-GA
CD163	5'-AAG-CTG-ATG-TGG-TTT-GCA-GG	5'-CCA-TTG-CCA-GTT-CTT-GCA-GT
HIF-1α	5'-TGA-TCG-TCT-GGC-TGC-TGT-AA	5'-TCC-AAG-AAG-CCC-TAA-CGT-GT
NOX2	5'TTA-GTG-GGA-GCA-GGG-ATT-GG	5'-GGC-ATT-GTT-CCT-TTC-CTG-CA
NCF1 (P47PHOX)	5'-CCT-CAT-TGT-CCA-GTG-TGG-TG	5'-TCT-TCC-GTC-TCG-TCA-GGA-CT
COX2	5'-TGA-GCA-TCT-ACG-GTT-TGC-TG	5'-TGC-YYG-TCT-GGA-ACA-ACT-GC
ALOX5	5'-ACT-TCG-CCG-ACT-TTG-AGA-AA	5'-CAA-GGG-TGA-CCA-CAG-TGA-TG
ALOX12	5'-AGT-TCC-TCA-ATG-GTG-CCA-AC	5'-GCA-GCC-AGG-TAT-TGC-TTC-TC
ALOX15	5'-AGC-CTG-ATG-GGA-AAC-TCT-TG	5'-AGG-TGG-TGG-GGA-TCC-TGT

** Protocole ROS : évaluation de la production basale et induite de ROS par les monocytes*

Pour chaque échantillon, 1 million de PBMC a été distribué dans un puits d'une plaque de culture avant d'être incubé 2 heures à l'étuve (37°C, 5% CO_2) avec du milieu de culture. Après élimination du surnageant, les monocytes ayant adhéré au fond des puits ont été lavés avec 300µl de $HBSS^{+}/^{+}$ (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, Invitrogen) et 150µl de luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione, Sigma) ont été ajoutés à une concentration de 66 µM dans chacun des 23 puits. La production basale de ROS a été mesurée par chimioluminescence à l'aide d'un luminomètre (Envision, Perkin Elmer) dont la température a été maintenue à 37°C tout au long de la lecture. La chimioluminescence générée a été mesurée toutes les 30 secondes pendant 40 minutes. A la suite de cette première lecture et afin de déterminer la capacité des monocytes à induire la production de ROS, 30µl de TPA (tetradecanoylphorbol 13-acetate, Sigma), molécule connue pour être un inducteur de ROS en activant la protéine kinase C, ont été rajoutés dans chaque puits immédiatement avant une seconde mesure à nouveau toutes les 30 secondes pendant 40 minutes. Les analyses ont été effectuées en calculant les aires sous courbe sur 40 minutes des deux situations puis en déterminant le ratio capacité d'induction / production basale de ROS. Les échantillons pour lesquels nous n'avons pas pu distribuer 1 million de PBMC n'ont pas été pris en compte dans l'analyse finale.

<u>Analyse statistique :</u>

Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel Prism (version 8.1.0). Le groupe « CM J0 Survie » inclus l'ensemble des patients CM sortis de l'hôpital avec accord du médecin et considérés comme guéris. Un seul enfant, sorti à J3 mais contre l'avis du personnel de santé a été retiré de l'analyse finale car son devenir clinique nous était inconnu. Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour établir les comparaisons de valeurs continues entre les groupes et le test du Chi2 a permis de comparer les variables nominales. Le test de corrélation de Spearman a permis d'établir les corrélations entre deux variables continues, la valeur rho indiquant le niveau de corrélation. Le taux de significativité des tests statistiques a été fixé à $p < 0,05$.

III-3. Résultats

III-3.1) Détermination des groupes cliniques définitifs

Au total, 246 patients (161 UM et 85 CM) ont été recrutés de mars à novembre 2018. Après l'analyse des critères clinico-biologiques nécessaires à la répartition des enfants dans chacun des deux groupes de paludisme, 97 enfants UM et 73 CM ont finalement été inclus dans l'analyse finale. Les raisons de ces exclusions sont expliquées dans la figure 27. Pour le groupe UM, un problème de diagnostic à l'aide de TDR a été rencontré, ayant engendré un nombre important de faux positifs (négatifs en goutte épaisse, n=29). Les autres causes d'exclusion sont des critères de gravité (n=5), des parasitémies inférieures à 1000/µL ou supérieures à 500 000/µL de sang, l'absence de prélèvement sanguin. Pour les CM, les principales causes d'exclusion étaient liées à une infection non palustre ou une coinfection impliquant un pathogène susceptible de causer un coma, comme par exemple le virus West Nile. Dans le groupe CM, 49 enfants (soit plus de 67% des patients inclus dans ce groupe) sont sortis de l'hôpital dans la semaine ayant suivi leur admission, avec des critères clinico-biologiques normaux et l'accord du personnel médical. Parmi eux, 43 enfants ont pu avoir une visite de suivi à J21 et seulement 6 patients ont été perdus de vue (12%). Nous avons choisi de garder ces 6 patients pour les analyses des points J0 et J3 et de les analyser comme des patients guéris. En parallèle, 23 enfants sont décédés du neuropaludisme au cours de leur prise en charge à l'hôpital (soit 31,5%), tous avant le point J3. Un enfant sorti avec accord du personnel hospitalier est décédé chez lui quelques jours après et a été retenu dans le groupe « CM J0 décès » lors de l'analyse finale. Un autre enfant sorti avant J3 et sans accord du personnel médical n'a pas été gardé dans l'analyse finale.

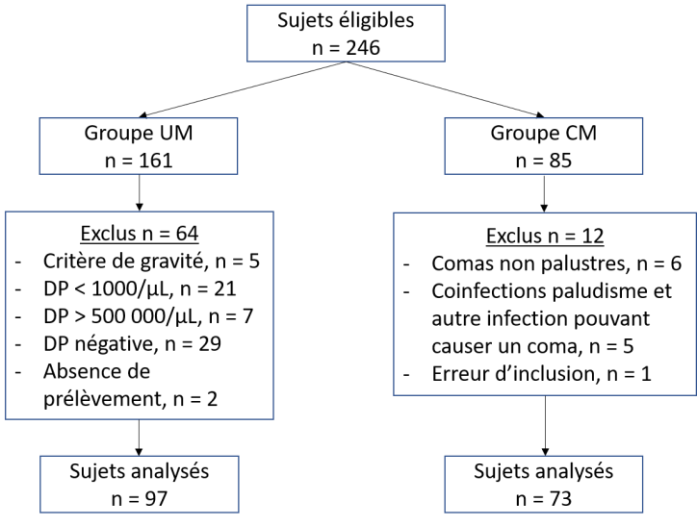


Figure 27 : Diagramme de flux de l'étude NEUROCM (2018, Bénin)

III-3.2) Caractéristiques socio-démographiques et clinico-biologiques des patients NEUROCM

Les données socio-démographiques, les informations sur le parcours clinique et les symptômes précédant l'accès palustre, ainsi que les données clinico-biologiques des patients lors de leur admission à l'hôpital sont présentées dans les tableaux 12, 13, 14 et 15.

III-3.2.1/ Analyse des critères socio-démographiques des patients

Différentes données socio-démographiques ont été analysées : l'âge, le sexe ainsi que l'utilisation d'une moustiquaire imprégnée comme moyen de prévention (Tableau 12). La comparaison de ces variables entre les 2 groupes cliniques indique que les enfants du groupe UM étaient plus âgés que les enfants du groupe CM (respectivement 54 et 45 mois, $p<0.0001$), contrairement aux résultats de notre première étude au Bénin où aucune différence d'âge n'avait été observée. De même, le ratio homme/femme est également inversé entre les deux groupes avec une majorité d'enfants de sexe masculin dans le groupe UM et de sexe féminin dans le groupe CM ($p=0.02$). De plus, les patients UM semblaient moins utiliser de moustiquaires imprégnées d'insecticides que les patients CM (respectivement 45 et 90%, $p<0.0001$).

Tableau 12 : Données socio-démographiques des patients de l'étude NEUROCM (2018, Bénin)

	UM (n = 97)	**CM (n = 73)**	***P***	**Test**
Age (mois)[a]	54.0 (± 13.5)	45.2 (± 12.1)	< 0.0001	UMW[b]
Ratio H/F	56/41	29/44	0.02	Chi2
Utilisation MI (%)[c]	44/95 (45.4)	65/72 (90.3)	< 0.0001	Chi2

[a]Moyenne(± déviation standard) ; [b]UMW : U de Mann-Whitney ; [c] n/N
MI = moustiquaire imprégnée

III-3.2.2/ Analyse des données déclaratives sur le parcours et les symptômes cliniques précédant l'accès palustre des patients

Le nombre de consultations de médecine « conventionnelle » et de médecine traditionnelle ainsi que la présence et la durée des principaux signes cliniques précédant la consultation d'inclusion des enfants du projet NEUROCM, mais également les symptômes cliniques décisifs pour la venue en consultation, sont présentés dans le tableau 13. Pour quasiment tous les patients UM (98%), la première consultation de médecine conventionnelle liée à l'accès palustre en cours était celle du projet NEUROCM, contrairement aux patients CM pour lesquels ce pourcentage n'était que de 11%. Dans ce dernier groupe, 89% des patients ont indiqué avoir bénéficié d'une, deux, ou plus de trois consultations de médecine conventionnelle précédant celle de notre étude (respectivement 47,9% 65,6% et 5,5%). De même, si aucun patient UM n'a déclaré avoir eu recours à la médecine traditionnelle pour le traitement de l'accès palustre en cours, environ 42,5% des patients CM ont indiqué une, deux, voire plus de trois consultations de médecine traditionnelle (respectivement 20,2%, 5,5% et 16,4%). Concernant les signes cliniques des patients avant leur arrivée dans les centres de santé, la fièvre était déjà observée chez l'ensemble des patients UM et CM mais sa durée a été rapportée comme étant plus longue chez les patients CM par rapport au groupe UM avec en moyenne 4,4 jours contre 2,2 jours respectivement ($p<0.0001$). Si aucun patient UM n'a présenté de coma avant la consultation d'inclusion dans notre étude, la grande majorité des patients CM (87,7%) a subi au moins une période de coma d'une durée moyenne de 1,2 jours, justifiant pour plus de 80% d'entre eux leur arrivée à l'hôpital. Des céphalées ont également été observées chez les patients UM (3,1%) et CM (15,1%, $p=0.005$). Des douleurs abdominales et une perte d'appétit ont été indiquées respectivement chez 4,1 et 6,2% des patients UM contre 18,1 et 60,3% chez les patients CM ($p<0.0001$). Des vomissements ont été observés chez 20,6% des patients UM contre 64,4% des CM ($p<0.0001$). Aucun enfant UM n'a présenté de diarrhée avant son arrivée au centre de santé contrairement au groupe CM où 5,5% des patients ont rapporté au moins un épisode diarrhéique ($p=0.02$) sans que cela ne justifie leur venue à l'hôpital. De plus, aucune différence de pourcentage n'a été observée concernant la présence d'une toux chez les enfants UM et CM. Enfin, d'autres symptômes cliniques ont été décrits comme la présence de convulsions, d'asthénie, l'observation d'urines foncées, des geignements, d'une oligurie (diminution de la production urinaire) et d'une pâleur sévère. Ainsi, 7,2% des patients UM ont présenté au moins un de ces signes cliniques avant leur arrivée au centre de santé contre 61,6% chez patients CM ($p<0.0001$).

Tableau 13 : Données déclaratives sur le parcours clinique et les symptômes cliniques précédant l'inclusion des patients dans l'étude NEUROCM (2018, Bénin)

	UM (n = 97)	**CM (n = 73)**	***P***	**Test**
Nb consultations de médecine « conventionnelle » précédant la présente consultation	0 : 95/97 (98.0%) 1 : 2/97 (2.0%)	0 : 8/73 (11.0%) 1 : 35/73 (47.9%) 2 : 26/73 (35.6%) ≥ 3 : 4/73 (5.5%)	< 0.0001[a]	Chi2
Nb consultations de méd. traditionnelle précédant la présente consultation	0 : 97/97 (100%)	0 : 42/73 (57.5%) 1 : 15/73 (20.5%) 2 : 4/73 (5.5%) ≥ 3 : 12/73 (16.4%)	< 0.0001[a]	Chi2
Signes cliniques précédant l'accès				
Coma	0/97 (0%)	64/73 (87.7%)	< 0.0001	Chi2
Fièvre	97/97 (100%)	73/73 (100%)	-	-
Céphalée	3/97 (3.1%)	11/73 (15.1%)	0.005	Chi2
Douleurs abdominales	4/97 (4.1%)	13/72 (18.1%)	0.006	Chi2
Perte appétit	6/97 (6.2%)	44/73 (60.3%)	<0.0001	Chi2
Vomissement	20/97 (20.6%)	47/73 (64.4%)	< 0.0001	Chi2
Diarrhée	0/97 (0%)	4/73 (5.5%)	0.02	Chi2
Toux	13/97 (13.4%)	12/73 (16.4%)	ns	Chi2
Autre[b]	7/97 (7.2%)	45/73 (61.6%)	< 0.0001	Chi2
Durée en jours[c]				
Coma	-	1.2 (± 0.4)	-	-
Fièvre	2.2 (± 0.6)	4.4 (± 1.9)	< 0.0001	UMW
Perte appétit	1.7 (± 0.5)	3.3 (± 2.2)	ns	UMW
Vomissement	1.6 (± 0.6)	2.0 (± 1.1)	ns	UMW
Symptôme décisif pour la venue à l'hôpital ou centre de santé				
Coma	-	50/62 (80.6%)	-	-
Fièvre	96/96 (100%)	2/70 (2.9%)	< 0.0001	Chi2
Céphalée	1/2 (50.0%)	0/11 (0%)	0.01	Chi2
Douleurs abdominales	0/4 (0%)	1/11 (9.1%)	ns	Chi2
Perte appétit	0/4 (0%)	0/39 (0%)	-	-
Vomissement	1/18 (5.6%)	1/42 (2.4%)	ns	Chi2
Diarrhée	-	0/4 (0%)	-	-
Toux	2/12 (16.7%)	0/10 (0%)	ns	Chi2

[a]Comparaison du critère « au moins une consultation» ; [b]Autre : convulsions (68%), asthénie (17%), urines foncées (7.5%), geignement, oligurie, pâleur sévère (<2%) ;
[c]Moyenne (± déviation standard)

III-3.2.3/ Analyse des données cliniques des patients

Le tableau 14 compare les données cliniques observées à l'inclusion entre les patients UM et CM. Si l'IMC reste une variable constante entre les formes cliniques, le poids des enfants UM était supérieur à celui des CM ($p<0.0001$). Ce résultat peut s'expliquer par l'âge plus avancé des enfants du groupe UM par rapport aux patients CM comme cela a été décrit précédemment. La température est quant à elle en corrélation avec la gravité palustre, avec une médiane de 37,9°C pour les UM contre 38,4°C chez les CM ($p=0.004$), résultats en accord avec ceux présentés lors de notre étude précédente. Le score de Blantyre était bien évidemment plus élevé chez les patients UM que chez les CM puisqu'il s'agit d'un critère d'inclusion pour les CM ($p<0.0001$) ; dans le groupe CM, la moyenne était de 1,7. Un fond d'œil anormal a été observé à J1 chez 34% des enfants CM soulignant la sévérité des dommages neurologiques (Figure 28). De plus, le pouls et la fréquence respiratoire sont corrélés à la gravité palustre avec respectivement une mesure à 125 et 42 bpm dans le groupe UM contre 152 et 49,6 bpm chez les CM ($p<0.0001$). La moitié des enfants CM ont présenté des convulsions répétées et 41,1% étaient gravement anémiés lors de leur inclusion dans l'étude, contrairement aux patients UM ($p<0.0001$). De même, un certain nombre de patients CM ont présenté des critères de gravité tels qu'une respiration acidosique (environ 25%), un œdème pulmonaire (42,5%), un ictère (environ 46%), une hypoglycémie (plus de 34%), une acidose métabolique (50%), une hyperlactatémie (environ 96%), une insuffisance rénale (environ 3%), ou encore une hépatomégalie (53,4%) et une splénomégalie (37%). Une hépatomégalie et une splénomégalie a également été retrouvée dans 9,4 et 18,9% des patients UM.

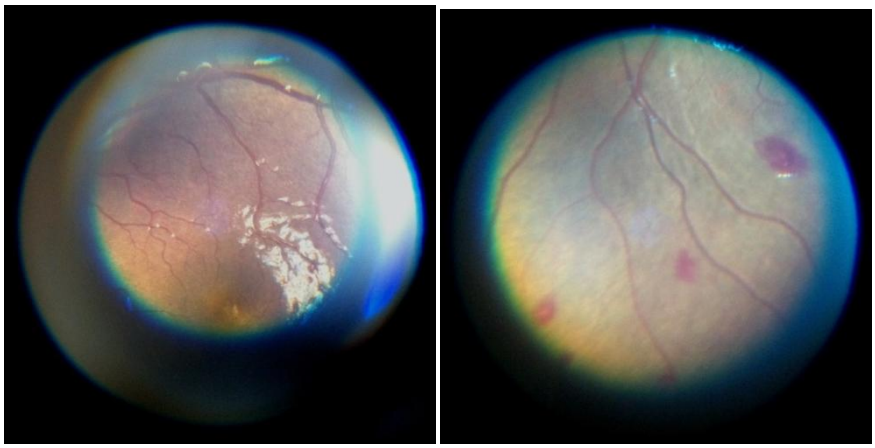


Figure 28 : Fonds d'œil d'enfants atteints de neuropaludisme issus de l'étude NEUROCM. A gauche : fond d'œil normal. A droite : fond d'œil anormal avec de multiples hémorragies rétiniennes

Tableau 14 : Données cliniques à l'inclusion des patients de l'étude NEUROCM (2018, Bénin)

	UM (n = 97)	CM (n = 73)	*P*	Test
Poids (Kg)	17.4 (± 14.8)	12.6 (± 2.4)	< 0.0001	UMW
IMC	15.7 (± 13.5)	14.6 (± 2.2)	ns	UMW
Température (°C)	37.9 (± 1.1)	38.4 (± 1.1)	0.004	UMW
Score de Blantyre	5 (± 0)	1.7 (± 0.5)	< 0.0001	UMW
Fond d'œil anormal*	0	37/56 (33.9%)	< 0.0001	Chi2
Pouls (bpm)	125 (± 21.9)	152 (± 21.6)	< 0.0001	UMW
Fréquence respiratoire (bpm)	41.9 (± 6.0)	49.6 (± 12.7)	< 0.0001	UMW
Convulsions répétées	0/97 (0%)	36/72 (50.0%)	< 0.0001	Chi2
Anémie grave (Hb<5 g/dL)	0	30/73 (41.1%)	< 0.0001	Chi2
Respiration acidosique	0/97 (0%)	18/73 (24.7%)	< 0.0001	Chi2
Œdème pulmonaire	0/97 (0%)	31/73 (42.5%)	< 0.0001	Chi2
Ictère (bilirubine totale >29,2 mg/L)	0/97 (0%)	33/72 (45.8%)	< 0.0001	Chi2
Hypoglycémie (glycémie <0,4 g/L)	0/97 (0%)	25/73 (34.2%)	< 0.0001	Chi2
Acidose métabolique (bicarbonate plasmatique <15 mmol/L)	0/97 (0%)	36/72 (50.0%)	< 0.0001	Chi2
Hyperlactatémie (lactate plasmatique >5 mmol/L)	0/97 (0%)	69/72 (95.8)%	< 0.0001	Chi2
Insuffisance rénale (créatinine sérique >30 mg/L)	0/97 (0%)	2/69 (2.9)%	0.02	Chi2
Hépatomégalie	9/96 (9.4%)	39/73 (53.4%)	< 0.0001	Chi2
Splénomégalie	18/95 (18.9%)	27/73 (37.0%)	0.02	Chi2

Les données sont des moyennes (± déviation standard) et en effectif n/N (pourcentages). * Fond d'œil réalisé à J1 post-inclusion. IMC=indice de masse corporelle ; bpm=battement par minute ; Hb=hémoglobine

III-3.2.4/ Analyse des données biologiques des patients

Le tableau 15 compare les données biologiques observées à l'inclusion des patients UM et CM. La parasitémie médiane était largement augmentée dans le groupe CM (>90000/µL de sang) par rapport au groupe UM (environ 39000/µL de sang, p=0.03), comme cela avait été décrit dans notre autre étude en 2014/2016. Le nombre d'hématies, le taux d'Hb et l'hématocrite (traduisant le volume occupé par les GR par rapport au volume total du sang) étaient significativement plus élevés dans le groupe UM par rapport au groupe CM (respectivement $3{,}8.10^6$/µL, 9,2g/dL et 28,7% chez les UM et $2{,}3.10^6$/µL, 5,8g/dL et 17% chez les CM, p<0.0001), résultats attendus puisqu'en partie liés à la définition des groupes cliniques. Chez les patients CM, ces trois paramètres biologiques étaient largement inférieurs aux valeurs normales indiquées pour un enfant âgé de 2 à 6 ans (554). Le VGM (Volume Globulaire Moyen, rendant compte du volume moyen des GR dans le sang), la TCMH

(Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine, désignant la quantité moyenne d'Hb se trouvant dans un GR), et la CCMH (Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine, caractérisant la quantité d'Hb présente dans 100ml de GR), présentaient des valeurs normales dans le sang des patients UM et CM, bien que des taux plus bas de VGM et plus élevés de TCMH et CCMH aient été détectés chez les enfants CM par rapport aux UM ($p=0.05$, $p=0.02$ et $p<0.0001$ respectivement). De plus, le nombre de leucocytes comptés dans le sang était supérieur dans le groupe CM comparé aux UM, avec en moyenne $7{,}5.10^3$ leucocytes/µL de sang chez les UM et $16{,}7.10^3$ leucocytes/µL de sang chez les CM ($p<0.0001$). Parmi ces globules blancs, on observe chez les CM un nombre plus important de polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et de lymphocytes par rapport au groupe UM ($p<0$ .0001, $p=0.002$ et $p<0.0001$, respectivement). Les basophiles étaient quand à eux nettement diminués dans le groupe CM comparé au groupe UM ($p=0.0002$) et aux valeurs normales de référence chez l'enfant sain. De manière inattendue, le nombre de monocytes était similaire entre les deux groupes. Si un faible nombre de plaquettes a également été observé chez les deux groupes de patients, elle est bien plus marquée chez les CM par rapport aux UM avec respectivement une moyenne de 195.10^3 et 112.10^3 plaquettes/µL de sang ($p<0.0001$). De plus, comme cela a été discuté précédemment, plus de 34% des patients CM présentaient une hypoglycémie à J0 (traduisant un taux de glycémie inférieur à 0,4 g/L) pour une moyenne de 0,8 g/L dans ce groupe, contre 1,0 dans le groupe UM ($p<0.0001$), résultats en accord avec ceux présentés dans notre étude précédente. Les concentrations de créatinine sanguine, marqueur de l'altération de la fonction rénale des patients et permettant également, de part son métabolisme, l'évaluation du bon fonctionnement des muscles, étaient augmentées chez les patients CM par rapport aux UM (6,2 contre 3,4 mg/L, $p<0.0001$) et aux valeurs normales décrites chez l'enfant sain. Enfin, le taux de bilirubine totale était largement augmenté, principalement chez les patients CM avec une moyenne de 35,7mg/L dans ce groupe et 11,2mg/L dans le groupe UM ($p<0.0001$) pour une valeur normale considérée à 6,5mg/L chez l'enfant sain. Ce résultat complète les données cliniques précédemment discutées indiquant qu'environ 46% des patients CM présentaient un ictère défini par un taux de bilirubine totale supérieur à 29,2 mg/L.

Tableau 15 : Données biologiques à l'inclusion (J0) des patients de l'étude NEUROCM (2018, Bénin)

	Valeurs de références*	**UM (n = 97)**	**CM (n = 73)**	***P*[§]**
Parasitémie (/µL de sang)	-	38 860 (10 195 – 97 202)	90 666 (12 425 – 421 278)	0.03
Hématies (10^6/µL)	4,6 (± 0.7)	3.8 (± 0.7)	2.3 (± 1.0)	< 0.0001
Hémoglobine (g/dL)	12,5 (± 1.5)	9.2 (± 1.7)	5.8 (± 2.2)	< 0.0001
Hématocrite (%)	36 (± 4.0)	28.7 (± 4.6)	17.0 (± 6.9)	< 0.0001
VGM (fl)	79,5 (± 7.5)	76.5 (± 7.3)	74.5 (± 8.4)	0.05
TCMH (pg)	27 (± 3)	24.5 (± 2.2)	25.6 (± 3.4)	0.02
CCMH (g/dL)	34 (± 3)	32.2 (± 1.7)	34.4 (± 3.2)	< 0.0001
Leucocytes (10^3/µL)	11 (± 6)	7.5 (± 3.5)	16.7 (± 11.2)	< 0.0001
Neutrophiles (10^3/µL)	5.0 (± 3.5)	4.0 (± 3.0)	9.8 (± 7.1)	< 0.0001
Eosinophiles (10^3/µL)	0.4 (± 0.3)	0.1 (± 0.2)	0.2 (± 0.2)	0.002
Basophiles (10^3/µL)	0.08 (± 0.06)	0.03 (± 0.06)	0.001 (± 0.01)	0.0002
Lymphocytes (10^3/µL)	5.5 (± 4)	2.5 (± 1.6)	5.8 (± 4.5)	< 0.0001
Monocytes (10^3/µL)	0.7 (± 0.6)	0.9 (± 0.5)	1.0 (± 0.8)	ns
Plaquettes (10^3/µL)	376 (± 182)	195 (± 120)	112 (± 96.0)	< 0.0001
Glucose (g/L)	1.1 (± 0.2)	1.0 (± 0.2)	0.8 (± 0.7)	< 0.0001
Créatinine (mg/L)	2.7 (± 1.7)	3.4 (± 0.5)	6.2 (± 7.1)	< 0.0001
Bilirubine totale (mg/L)	6,5 (± 3.5)	11.2 (± 6.4)	35.7 (± 32.9)	< 0.0001

Les données sont des moyennes (± déviation standard), sauf pour la parasitémie (médiane, 25-75ème percentile)
*Pour l'enfant de 2 à 6 ans (source : hematocell.fr (554))
§ UM versus CM by the Mann-Whitney U-test

III-3.3) Cinétique des sous-populations monocytaires au cours du neuropaludisme

Une analyse par cytométrie en flux a permis d'évaluer l'évolution des pourcentages des sous-populations monocytaires et de leurs états d'activation dans le sang périphérique des enfants UM et CM à J0 puis à J3 et J21 pour les patients CM. Pour cela, 5 groupes de 23 patients ont été constitués : « UM J0 », « CM J0 Survie », « CM J0 Décès », « CM J3 » et « CM J21 ». Cela nous a permis 1/ de comparer les résultats à J0 entre les deux formes clinique de paludisme, 2/ d'identifier les différences entre les patients ayant survécu et ceux qui sont décédés à J0 dans le groupe CM et 3/ d'établir une cinétique d'évolution de la réponse monocytaire au cours de la résolution de l'infection grâce à la comparaison des points J0-J3-J21 chez les mêmes enfants CM.

III-3.3.1/ Stratégie de gating des sous-populations monocytaires

La stratégie de gating des sous-populations monocytaires humaines du sang périphérique est présentée dans la figure 29, selon le protocole décrit par Marimuthu *et al* (5). Dans un premier temps, les monocytes ont été sélectionnés en fonction de leur taille et de leur granulosité (FSC-A/SSC-A) afin d'exclure une grande partie des lymphocytes, cellules NK et polynucléaires. Les doublets ont ensuite été enlevés et les cellules vivantes ont été séparées des cellules mortes par l'utilisation du Live-Dead. En complément des marqueurs classiques CD14 et CD16, l'utilisation de HLA-DR comme troisième marqueur a permis d'éliminer les cellules NK et neutrophiles qui ne l'expriment pas. Les lymphocytes (B et T) exprimant HLA-DR ont été séparés des monocytes grâce à l'absence d'expression du CD14. Les trois sous-populations monocytaires ont finalement été identifiées par leurs différents niveaux d'expression de CD14 et CD16 : monocytes classiques (CD14+ CD16-), monocytes intermédiaires (CD14+ CD16+) et monocytes non-classiques (CD14- CD16+).

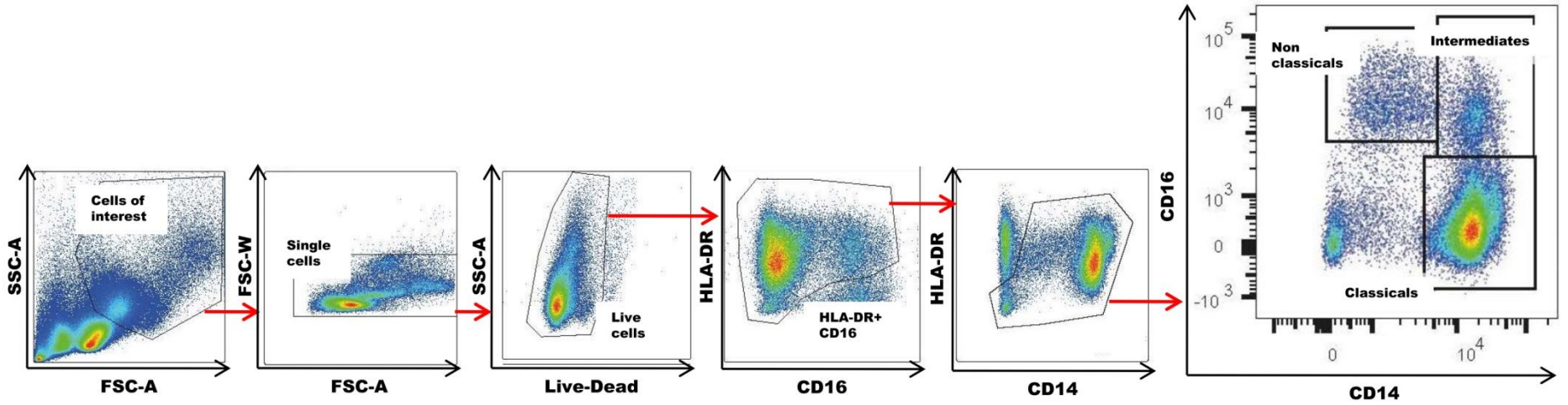


Figure 29 : Stratégie de gating des sous-populations monocytaires dans le sang périphérique des patients NEUROCM par cytométrie en flux selon le protocole décrit par Marimuthu *et al* (5). Dans un premier temps, les monocytes ont été sélectionnés en fonction de leur taille et de leur granulosité (FSC-A/SSC-A) afin d'exclure une grande partie des lymphocytes, cellules NK et polynucléaires. Les doublets ont ensuite été enlevés et les cellules vivantes ont été séparées des cellules mortes par l'utilisation du Live-Dead. En complément des marqueurs classiques CD14 et CD16, l'utilisation de HLA-DR comme troisième marqueur a permis d'éliminer les cellules NK et neutrophiles. Les lymphocytes (B et T) exprimant HLA-DR ont été séparés des monocytes grâce à l'absence d'expression du CD14.

III-3.3.2/ Pourcentages des sous-populations monocytaires dans chacun des groupes

Afin de mieux caractériser la réponse monocytaire, les pourcentages de chacune des 3 sous-populations monocytaires ont été déterminés dans les 5 groupes de patients. Les résultats sont présentés dans la figure 30 et les corrélations entre ces pourcentages et les parasitémies des patients ont été rapportés dans le tableau 16.

En accord avec les données de la littérature, les monocytes classiques représentaient plus de 85% des cellules monocytaires (5) et ne semblaient pas évoluer en fonction de la gravité palustre, ni en fonction du devenir clinique des patients comme cela avait été le cas lors de l'étude 2014/2016. De même, ce pourcentage de monocytes classiques n'avait pas d'incidence sur le processus de résolution de l'infection comme cela avait été le cas dans notre modèle murin. Si aucune association n'a été observée chez les patients CM, le pourcentage de monocytes classiques était positivement corrélé à la densité parasitaire des enfants UM ($p=0.002$).

Contrairement à ce qui avait été observé lors de notre étude précédente et chez la souris, le pourcentage de monocytes intermédiaires était nettement plus faible chez les enfants décédés du neuropaludisme (2,7%) comparé à celui des 4 autres groupes, avec environ 9% pour les « UM J0 », 8% pour les « CM J0 Survie », 5% pour les « CM J3 » et 6% pour les « CM J21 ». Aucune différence n'a été observée entre les groupes UM et CM J0 Survie ni entre les groupes CM J3 et J21. En revanche, le pourcentage de monocytes intermédiaires a diminué entre J0 et J3 chez les patients CM. Enfin, et contrairement aux monocytes classiques, le pourcentage de monocytes intermédiaires était inversement corrélé à la parasitémie dans le groupe UM (Tableau 16).

Le pourcentage de monocytes non-classiques était quant à lui plus faible dans les deux groupes CM J0 (Survie/Décès) par rapport au groupe UM, avec respectivement 6% pour les CM et 14% pour les UM. Ce pourcentage ne semble pas avoir eu d'incidence sur le devenir clinique des patients CM car aucune différence n'a été observée à J0 entre les patients décédés et ayant survécus au neuropaludisme, contrairement aux résultats de l'étude 2014/2016. Enfin, une légère augmentation de ce pourcentage a été observée à J21 par rapport à J3 (respectivement à 8 et 4%) bien que cette augmentation ne soit pas significative. Tout comme les monocytes intermédiaires, le pourcentage de monocytes non-classiques était inversement corrélé à la parasitémie dans le groupe UM.

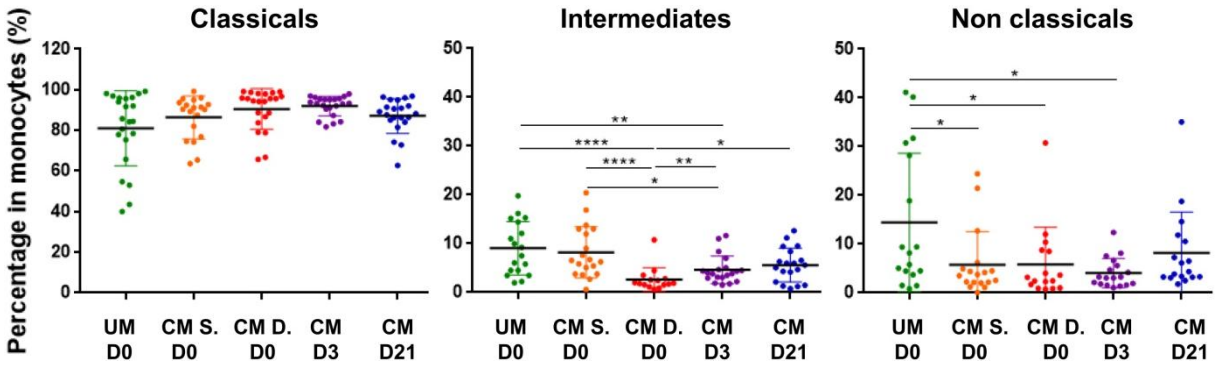


Figure 30 : Evolution des sous-populations monocytaires dans le sang périphérique des patients UM à J0 et CM à J0-J3-J21. Les pourcentages ont été déterminés parmi les cellules monocytaires. Les pourcentages ont été comparés en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. UM : uncomplicated malaria, CM : cerebral malaria, S. : survie, D. : décès.

Tableau 16 : Corrélations entre les parasitémies et les pourcentages des sous-populations monocytaires présentes dans le sang périphérique des patients UM et CM à J0. Le test de corrélation de Spearman a été utilisé. La valeur rho et le degré de significativité sont présentés pour chaque corrélation identifiée. UM : uncomplicated malaria, CM : cerebral malaria.

Parasitémie		R de Spearman
UM	Classiques	**0.64 (p=0.002 ***)**
	Intermédiaires	**-0.71 (p=0.001 ***)**
	Non classiques	**-0.61 (p=0.01 **)**
CM J0 Survie	Classiques	ns
	Intermédiaires	ns
	Non classiques	ns
CM J0 décès	Classiques	ns
	Intermédiaires	ns
	Non classiques	ns

III-3.4) Caractérisation des sous-populations monocytaires au cours du neuropaludisme

III-3.4.1/ Etude protéique

Afin de mieux comprendre le rôle de chacune des trois sous-populations monocytaires présentes dans le sang périphérique des patients UM et CM au cours de l'infection palustre (J0) et de sa résolution (J3-J21), différents marqueurs ont été analysés à la surface des monocytes par cytométrie en flux : CD14, CD16, CCR2, CX3CR1, HLA-DR, CD36 et

CD163. Les intensités de fluorescence médianes de ces marqueurs sont présentées dans la figure 31.

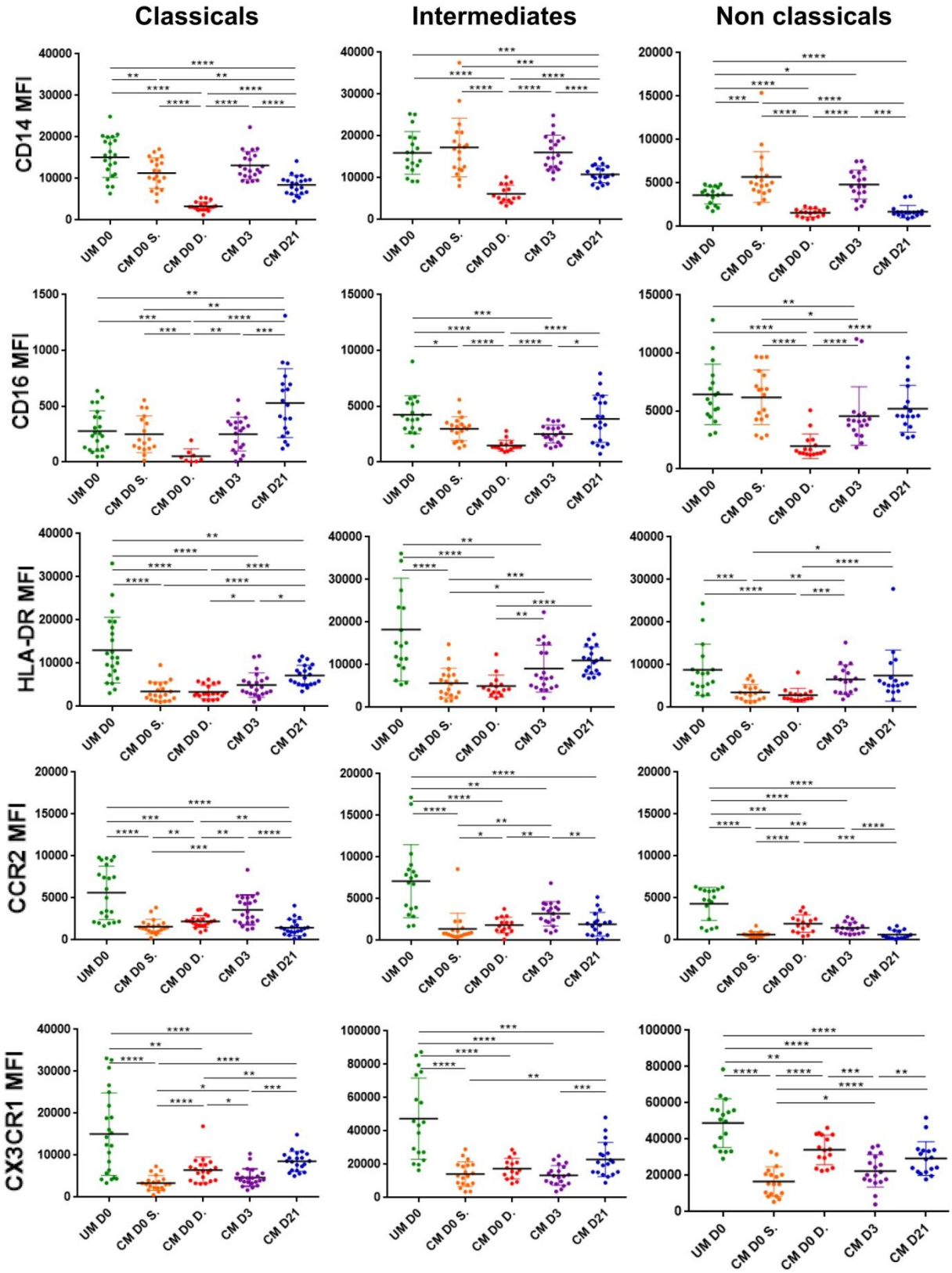
De façon globale, l'évolution de l'expression du CD14, récepteur de GPI et co-récepteur de TLR, à la surface des 3 sous-populations monocytaires a suivi des variations similaires entre les 5 groupes de patients bien que ce marqueur soit très majoritairement exprimé par les monocytes classiques et intermédiaires et très faiblement par les monocytes non-classiques. Une très faible expression du CD14, voire une absence d'expression de ce marqueur, a été observée dans le groupe CM J0 Décès comparée à celle des 4 autres groupes cliniques et ce dans les trois sous-populations de monocytes. De manière intéressante, une expression plus faible de CD14 a également été obtenue chez les monocytes classiques des patients CM J0 Survie par rapport au groupe UM J0 alors que son expression par les monocytes non-classiques était au contraire plus élevée dans ce groupe Survie par rapport aux UM. Enfin, si aucune différence n'a été mise en évidence entre les groupes CM J0 Survie et CM J3, une diminution de l'expression de CD14 a été obtenue à J21 dans les trois sous-populations monocytaires. De la même manière, l'expression de CD16, récepteur impliqué dans la phagocytose opsonique des GRi par *P. falciparum*, évolue de façon similaire à la surface des 3 sous-populations monocytaires, bien que ce récepteur soit très majoritairement exprimé par les monocytes intermédiaires et non-classiques. On souligne une expression similaire entre les groupes UM J0 et CM J0 Survie, sauf pour les monocytes intermédiaires pour lesquels CD16 est plus faiblement exprimé chez les patients CM J0 Survie. En revanche, son expression était quasiment nulle chez les patients CM J0 Décès en comparaison aux 4 autres groupes cliniques, résultat en accord avec ceux établis lors de notre précédente étude au Bénin. Chez les CM, on note une réaugmentation du niveau d'expression de CD16 à J3 puis J21 dans les trois sous-populations, pour revenir à J21 à un niveau d'expression similaire à celui des UM J0.

Comme précédemment, l'évolution de l'expression de HLA-DR, l'équivalent du CMH-II chez la souris, dans les 5 groupes cliniques semble similaire entre les 3 sous-populations monocytaires. Globalement, on observe un profil similaire à celui du CD16, sauf que le niveau d'expression d'HLA-DR est faible à la fois chez les CM Décès et les CM Survie, par rapport aux UM J0. A J3 et J21, les niveaux d'expression réaugmentent pour revenir à un niveau similaire à celui des UM (sauf pour les monocytes classiques pour lesquels le niveau d'expression de CD36 à J21 est encore à un niveau inférieur à celui des UM J0).

Concernant CCR2, récepteur de la chimiokine CCL2 impliquée dans le recrutement des monocytes et lymphocytes au cerveau, là aussi les variations de son expression semblent

identiques pour les 3 sous-populations monocytaires, bien qu'il soit plus faiblement exprimé par les monocytes non-classiques. Ainsi, nous observons que, pour ces trois populations, son expression était largement plus élevée dans le groupe UM J0 par rapport aux groupes CM J0 Survie et Décès. Etonnement, les monocytes des patients CM décédés présentaient une plus forte expression de CCR2 à J0 que les patients ayant survécus. A J3, son expression semblait augmenter pour diminuer à nouveau à J21 sur les trois sous-populations monocytaires. Pour CX3CR1 et en accord avec les données de la littérature, les monocytes classiques exprimaient plus faiblement le récepteur CX3CR1 par rapport aux deux autres sous-populations. De plus, son expression était plus élevée sur les monocytes des patients UM par rapport aux groupes CM. A J0, les monocytes classiques et non-classiques des patients CM décédés présentaient une plus forte expression de CX3CR1 par rapport aux patients ayant survécu, de même que CCR2. Pour les CM, à J3, le niveau d'expression augmentait légèrement voire pas du tout par rapport au J0 Survie, pour augmenter finalement à J21.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression du récepteur CD36, impliqué dans la phagocytose non-opsonique des GRi par *P. falciparum*, à la surface des 3 sous-populations monocytaires. CD36 était exprimé à un niveau plus élevé chez les monocytes intermédiaires et classiques, par rapport aux non-classiques, de même que dans notre précédente étude chez les patients. Le profil d'expression de CD36 ressemble à celui observé pour HLA-DR, avec des niveaux d'expression plus faibles dans les groupes CM J0 Survie et Décès, par rapport aux UM J0, et une augmentation à J3 et J21, particulièrement pour les monocytes classiques et intermédiaires. Pour les monocytes classiques, on observe un niveau d'expression légèrement plus élevé pour le groupe CM J0 Survie par rapport au groupe Décès. A l'inverse, une plus forte expression de CD36 était observée chez les monocytes non-classiques des patients CM J0 Décès par rapport au groupe « Survie ». Pour finir, nous avons regardé l'expression du récepteur CD163 impliqué dans l'internalisation du complexe Hb-Haptoglobine par les monocytes. Son expression était globalement plus élevée à J0 pour les groupes UM et CM Survie et Décès, par rapport aux valeurs obtenues à J3 et J21, et ce pour les trois sous-populations. On observe égaement que CD163 était exprimé avec des niveaux plus élevés par les monocytes intermédiaires, comparé aux autres sous-populations.


Classicals
Intermediates
Non classicals
CD14 MFI
CD16 MFI
HLA-DR MFI
CCR2 MFI
CX3CR1 MFI
UM D0
CM D0 S.
CM D0 D.
CM D3
CM D21

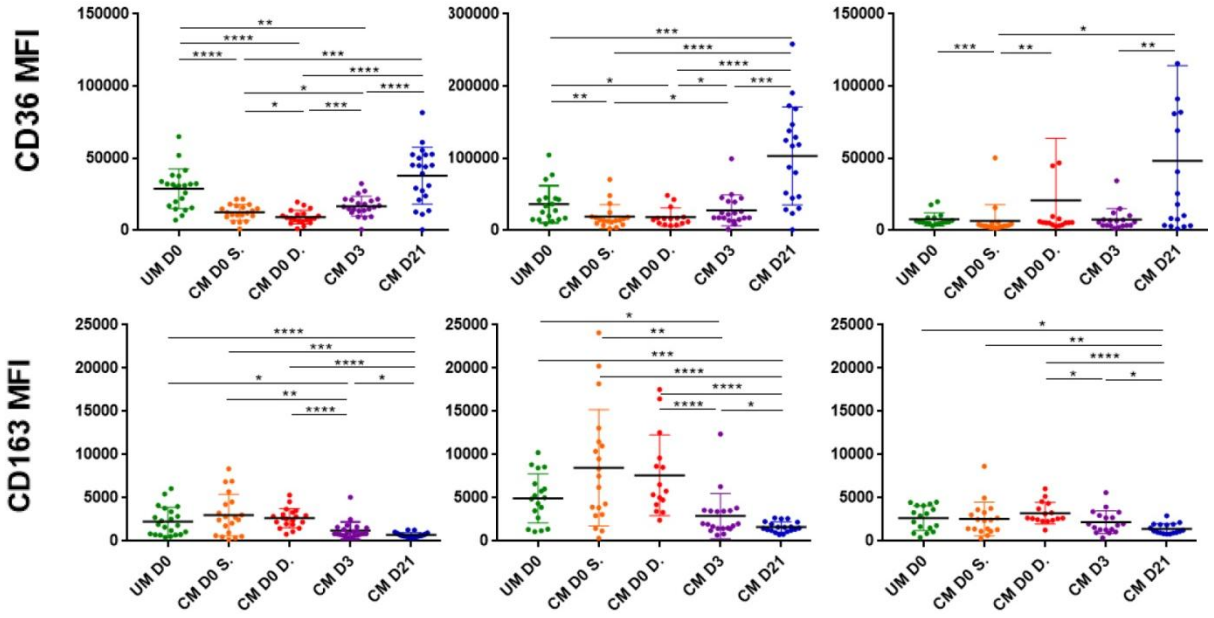


Figure 31 : Evolution des intensités de fluorescence médianes (MFI) des marqueurs CD14, CD16, HLA-DR, CCR2, CX3CR1, CD36 et CD163 à la surface des 3 sous-populations monocytaires dans le sang périphérique des patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM). Les MFI ont été comparées en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. UM : uncomplicated malaria, CM : cerebral malaria, S. : survie, D. : décès.

III-3.4.2/ Etude génique

Afin de mieux caractériser les trois sous-populations monocytaires, ces dernières ont été triées et séparées grâce aux marqueurs CD14, CD16, HLA-DR et Live-Dead, comme cela a été le cas pour l'analyse en cytométrie de flux. Leur ARNm a ensuite été extrait afin d'étudier l'expression de 12 gènes impliqués dans les réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes par RT-qPCR. La figure 32 présente les niveaux d'expression des gènes *Nrf2*, *PPARγ*, *HMOX1*, *CD36*, *CD163*, *HIF-1α*, *COX-2*, *ALOX15*, *NOX2* et *NCF1* par les sous-populations monocytaires du sang périphérique des patients NEUROCM. Les gènes de la 5-LOX et de la 12-LOX étant sortis pour très peu d'échantillons, nous les avons écartés de l'analyse finale.

Comme cela a déjà été discuté, Nrf2 et PPARγ sont deux facteurs de transcription clés de la réponse antioxydante, contrôlant l'expression de gènes tels que *HMOX1*, *CD36*, *CD163*, et *HIF-1a*. Les gènes *COX-2* et *ALOX15* codent pour deux enzymes intervenant dans le métabolisme de l'acide arachidonique (COX-2 et 15-LOX), et les gènes *NOX2* et *NCF1*, codant respectivement pour la NOX2 et la sous-unité p47phox de la NADPH oxydase, sont

impliqués dans les réponses pro-oxydantes de l'organisme en favorisant la production de ROS.

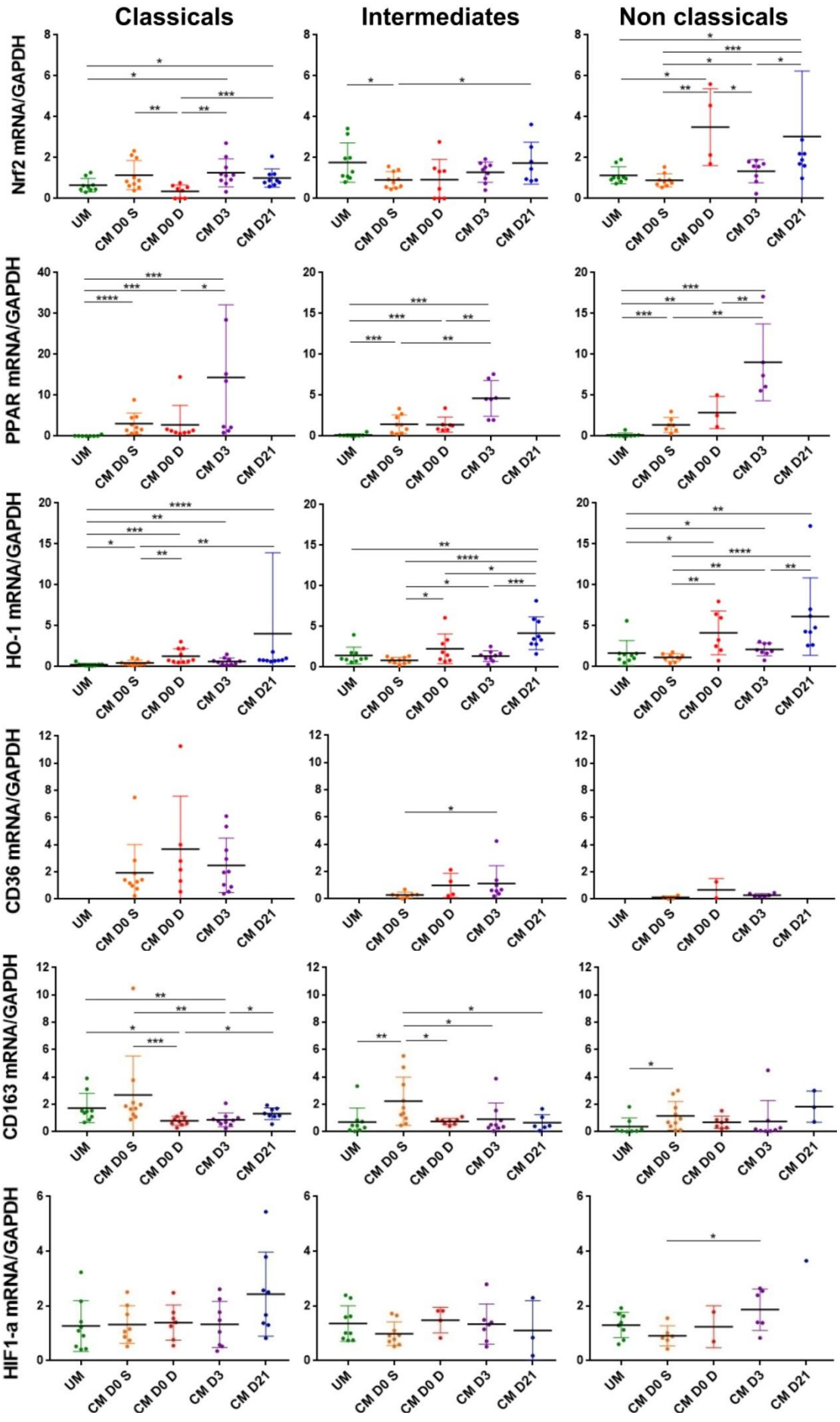
Dans notre étude, le profil d'expression génique de Nrf2 variait en fonction de la population monocytaire qui l'exprime. Pour les monocytes intermédiaires, l'expression de *Nrf2* était plus faible chez les CM J0 Survie comparée à celles des groupes UM J0 et CM J21 et aucune différence n'a été observée entre les groupes CM J0 Survie/Décès. Pour les monocytes non-classiques, on retrouve une plus forte expression de Nrf2 dans le groupe des CM J0 Décès, comparé aux groupes UM J0, CM J0 Survie et CM J3. A l'inverse, l'expression de *Nrf2* par les monocytes classiques était plus faible dans le groupe CM J0 Décès par rapport aux groupes CM J0 Survie, J3 et J21, mais similaire entre les groupes UM J0 et CM J0 Survie. Concernant PPARγ, aucun résultat n'a pu être déterminé dans le groupe CM J21 pour les 3 sous-populations monocytaires, très probablement car son expression était trop faible pour être détectée. A J0, une très faible expression de *PPARγ* par les 3 sous-populations cellulaires est observée dans le groupe UM par rapport aux groupes CM, sans différence entre le devenir clinique du patient (Survie/Décès). A J3, l'ensemble des monocytes des patients CM ont fortement exprimé *PPARγ*.

Les profils d'expression de *HMOX1* étaient similaires pour les trois sous-populations monocytaires. On observe une plus faible expression pour les groupes UM J0 et CM J0 Survie, alors que les groupes CM J0 Décès et CM J21 avaient des niveaux d'expression plus élevés. Pour les monocytes classiques, l'expression de *HMOX1* était plus élevée chez les CM J0 Survie, comparé aux UM J0. De façon surprenante, très peu de résultats ont pu être obtenus pour le gène *CD36*, aucun dans les groupes UM J0 et CM J21. Ces résultats inattendus vont à l'encontre de ceux observés précédemment lors du protocole de cytométrie et lors de l'étude patients 2014/2016 soulignant une différence majeure entre les expressions protéique et génique de CD36 lors d'une infection palustre. Pour CD163, on note une plus forte expression de *CD163* par les monocytes intermédiaires et non-classiques observée dans le groupe CM J0 Survie par rapport aux groupes UM J0 et CM J0 Décès. Concernant *HIF-1α*, peu de différences ont été observées, seule une augmentation de l'expression de ce gène par les monocytes non-classiques est observée à J3.

Si l'expression de *COX-2* par les populations intermédiaires et non-classiques ne semble pas varier au cours de l'infection palustre et de sa résolution dans notre étude, son expression par les monocytes classiques était largement supérieure dans le groupe CM J0 Survie comparée à celles des 4 autres groupes cliniques. Peu de résultats ont pu être déterminés concernant l'expression d'*ALOX15* par les monocytes intermédiaires et non-classiques. L'analyse de son

expression par les monocytes classiques indique que cette population surexprimait *ALOX15* dans le groupe CM J0 Survie, pour chuter à J21.

Pour *NOX2*, son expression par les monocytes classiques était plus faible à J0 pour les trois groupes de paludisme (UM, CM Survie, CM Décès) qu'à J3 et J21. Cette tendance est retrouvée pour les monocytes intermédiaires. A l'inverse, l'expression de *NOX2* par les monocytes non-classiques était plus faible dans le groupe UM J0 par rapport aux groupes CM J0 Survie, J3 et J21. Concernant *NCF1*, aucune différence d'expression n'a été observée chez les monocytes intermédiaires et non-classiques. Son expression par les monocytes classiques était plus importante dans le groupe CM J0 Survie par rapport aux groupes UM J0 et CM J21.


Classicals
Intermediates
Non classicals
Nrf2 mRNA/GAPDH
PPAR mRNA/GAPDH
HO-1 mRNA/GAPDH
CD36 mRNA/GAPDH
CD163 mRNA/GAPDH
HIF1-a mRNA/GAPDH
UM
CM D0 S
CM D0 D
CM D3
CM D21

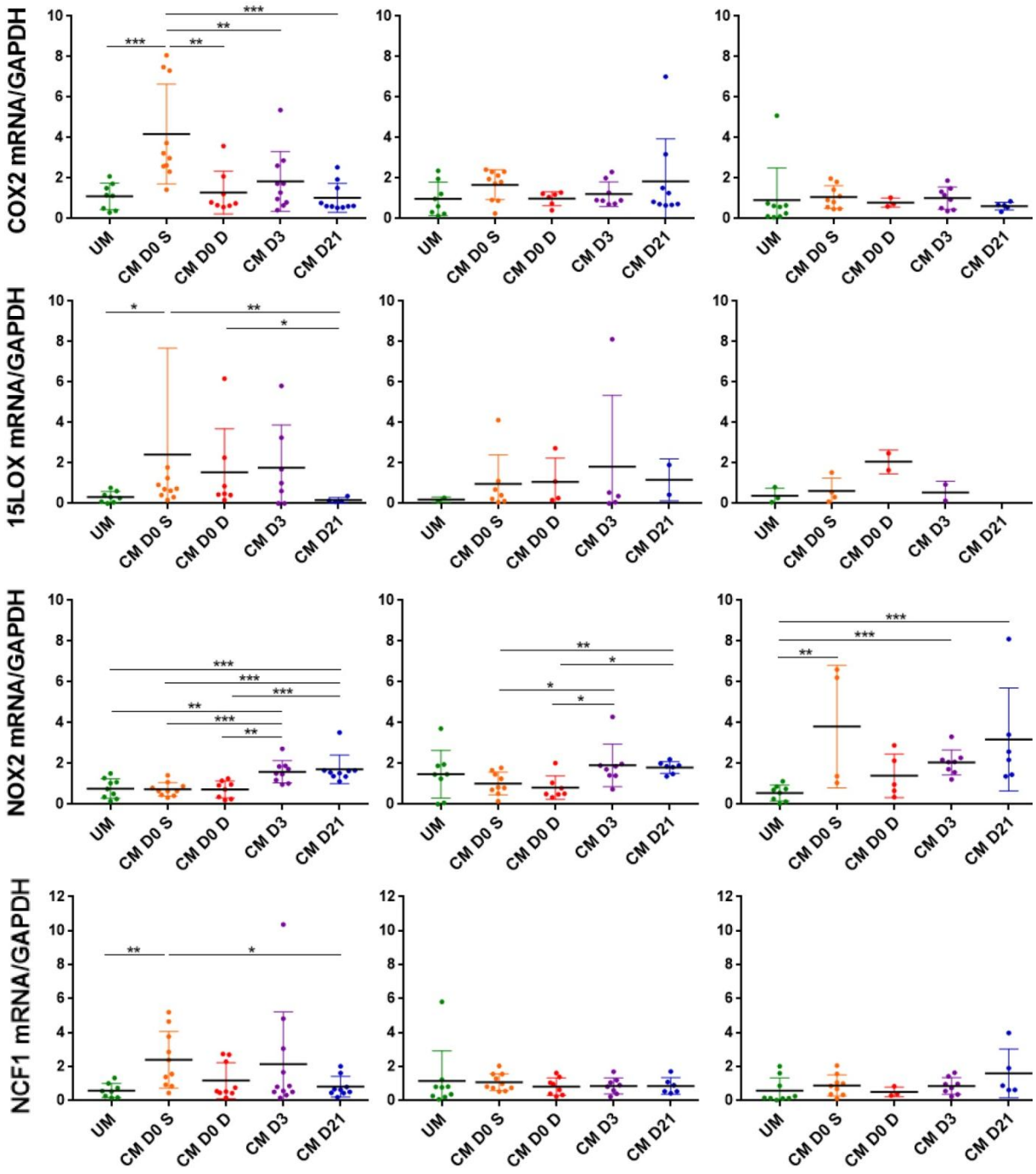
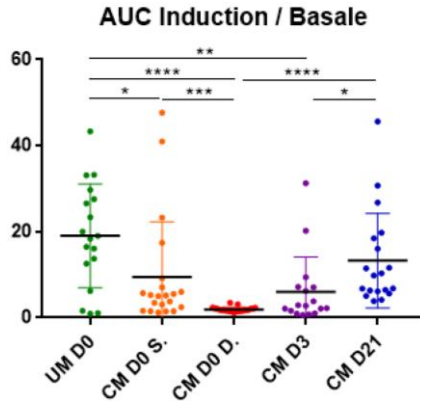


Figure 32 : Niveaux d'expression des gènes *Nrf2*, *PPARγ*, *HMOX1*, *CD36*, *CD163*, *HIF-1α*, *COX-2*, *ALOX15*, *NOX2* et *NCF1* chez les sous-populations monocytaires dans le sang périphérique des patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM). Les niveaux d'expression des gènes ont été comparés en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. UM : uncomplicated malaria, CM : cerebral malaria, S. : survie, D. : décès.

III-3.4.3/ Etude de la capacité des monocytes à produire des ROS

Dans le but d'apporter plus de précisions concernant le rôle des mécanismes pro-oxidants lors d'une infection palustre, nous avons quantifié la production basale de ROS par les monocytes des patients NEUROCM ainsi que leur capacité à produire ces ROS suite à une induction au TPA, durant 40min. Pour les 23 échantillons de chaque groupe clinique, le rapport « capacité d'induction de ROS / production basale » a été déterminé. La figure 33 présente les résultats du calcul des aires sous courbes et les corrélations entre ces dernières et les pourcentages des sous-populations monocytaires des patients. De façon très intéressante, nous voyons que la capacité d'induction des ROS est très faible voire totalement abolie à J0 lors d'un neuropaludisme et augmente au cours de la résolution à J21. Cette incapacité des monocytes à produire des ROS est également associée au décès des patients. Aucun lien n'a été trouvé entre pourcentage de sous-population à J0 et la capacité à produire des ROS, et ce quel que soit le groupe clinique.



% sous-pop / ROS			R de Spearman
UM		Classiques	ns
		Intermédiaires	ns
		Non classiques	ns
CM J0	Survie	Classiques	ns
		Intermédiaires	ns
		Non classiques	ns
CM J0	décès	Classiques	ns
		Intermédiaires	ns
		Non classiques	ns

Figure 33 : A gauche : Aires sous les courbes des rapports entre la production induite de ROS sur la production basale par les monocytes des patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM). Les capacités d'induction des ROS ont été comparées en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. A droite : Corrélations entre le rapport production induite de ROS / production basale par les monocytes et les pourcentages des sous-populations monocytaires des patients NEUROCM. Le test de corrélation de Spearman a été utilisé. La valeur rho et le degré de significativité sont présentés pour chaque corrélation identifiée. UM : uncomplicated malaria, CM : cerebral malaria, S. : survie, D. : décès.

III-3.4.4/ Dosage des cytokines et chimiokines dans les plasmas

Pour compléter nos résultats et pour avoir des données comparables à celles obtenus dans notre modèle murin d'ECM, nous avons déterminé, pour l'ensemble des enfants inclus dans l'étude, les concentrations de différents marqueurs pro- et anti-inflammatoires mis en place chez les patients au cours du paludisme simple ou du neuropaludisme : TNFα, Il-1β, Il-6, Il-8, IL-10, IL-12, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10, CCL17, CCL22, CXCL5, ICAM-1, Granzyme B, angiopoïétine-2 (par Luminex^{TM}), et l'EPCR (par ELISA). Les concentrations de ces marqueurs sont présentées dans la figure 34. Le tableau 17 (a et b) complète ces résultats en déterminant les corrélations entre les concentrations plasmatiques des marqueurs étudiés et les parasitémies et les pourcentages des sous-populations monocytaires de la circulation périphérique. Les quantités d'IL-12 dosées étaient insuffisantes et pour la grande majorité des échantillons aucune concentration n'a pu être mesurée expliquant l'absence de résultat pour ce marqueur. Pour l'Il-1β, seules quelques concentrations ont pu être déterminées dans chacun des groupes cliniques mais leurs valeurs étaient suffisamment différentes pour obtenir des données significatives.

Sur la figure 34 A, on observe que les concentrations des cytokines pro- et anti-inflammatoires étudiées (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8 et IL-10) étaient supérieures à J0 lors du neuropaludisme comparées à celles du groupe UM et que ces valeurs diminuaient à J3 et J21 avec la résolution de l'infection. Les concentrations de ces cytokines étaient également toutes associées au décès des patients, avec des valeurs toujours plus élevées dans le groupe CM J0 Décès comparé au groupe CM J0 Survie. Les concentrations de TNFα, IL-6 et IL-10 ont été positivement corrélées aux parasitémies des patients UM et CM (Survie/Décès) à J0 et celles de l'IL-1β et IL-8 aux parasitémies des patients CM décédés. Les concentrations d'IL-8 étaient également corrélées aux parasitémies des patients CM ayant survécu. Enfin, les concentrations d'IL-10 étaient inversement corrélées au pourcentage de monocytes intermédiaires chez les patients UM, suggérant que cette population n'est pas impliquée dans la production d'IL-10.

Concernant les chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites d'inflammation (B), de plus fortes concentrations étaient observées à J0 dans les groupes UM et CM pour l'ensemble des chimiokines étudiées, comparées à celles de J3 et J21. Si aucune différence entre les groupes UM et CM à J0 n'a été observée pour CCL4 et CXCL10 (contrairement aux résultats de notre étude 2014/2016), les concentrations de CXCL9 étaient plus élevées dans les groupes CM J0 et plus particulièrement dans le groupe

des décès, par rapport au groupe UM. Enfin, de fortes concentrations de CCL2 et CXCL9 étaient associées au décès des patients CM. L'étude des corrélations révèle que les concentrations de certaines chimiokines étaient associées aux parasitémies des patients UM (CCL2, CCL4, CXCL10), CM Survie (CCL3, CCL4, CXCL10) et CM Décès (CCL2, CCL3, CCL4). Enfin, les pourcentages des monocytes classiques étaient positivement corrélés aux concentrations de CXCL9 pour le groupe CM Survie, suggérant une implication des monocytes classiques dans la production de CXCL9 dans ce groupe clinique. Les pourcentages des monocytes intermédiaires étaient inversement corrélés aux concentrations de CCL2 et CCL4 pour le groupe UM. En ce qui concerne les pourcentages des monocytes non-classiques, ils étaient positivement associés aux concentrations de CXCL10 pour le groupe CM Décès, mais étaient en revanche inversement corrélés aux concentrations de CXCL9 pour le groupe CM Survie.

Pour les chimiokines CCL17, CCL22 et CXCL5, impliquées dans le recrutement des LTh2, LTreg et neutrophiles vers les sites d'inflammation (C), on observe une évolution similaire de la cinétique des concentrations entre chaque groupe avec des quantités plus faibles de ces chimiokines à J0, principalement lors du neuropaludisme mais sans différence entre les groupes Survie et Décès, puis une remontrée des concentrations à J3 puis J21. Les concentrations de ces 3 chimiokines étaient inversement corrélées aux parasitémies des patients des groupes UM pour CXCL5 et CM Survie pour CCL22. De plus, les pourcentages des monocytes non-classiques étaient positivement corrélés aux concentrations de CCL22 et CXCL5 pour le groupe CM Survie.

Enfin, nous nous sommes intéressés à 4 autres marqueurs souvent étudiés dans le cadre d'un neuropaludisme (D). Les concentrations plasmatiques d'ICAM-1, molécule d'adhésion connue pour jouer un rôle dans la cytoadhérence des GRi et des leucocytes à l'endothélium cérébral, étaient plus élevées à J0, comparées à celles de J3 et J21, et supérieures dans le groupe CM J0 Décès par rapport au groupe UM. Les concentrations de ce marqueur étaient été positivement corrélées aux parasitémies des groupes CM J0 (Survie/Décès). A l'inverse, de plus faibles concentrations plasmatiques d'EPCR, autre marqueur d'adhésion présent à la surface des cellules endothéliales, étaient observées dans le groupe CM J0 comparées à celles des groupes UM et CM J3, sans qu'aucune corrélation ne soit établie entre ces concentrations et les parasitémies ou les pourcentages des sous-populations monocytaires dans chacun des groupes cliniques. Enfin, que ce soit pour le granzyme B, molécule sécrétée par les LT cytotoxiques et impliquée dans l'apoptose des cellules endothéliales constituant la BHE, ou pour l'angiopoïétine-2, marqueur de l'angiogénèse, de fortes concentrations étaient observées

dans les groupes CM J0, plus particulièrement chez les décès. Pour le granzyme B, les concentrations observées à J3 étaient plus élevées qu'à J0, pour redescendre ensuite à J21. Pour l'angiopoïétine-2, les concentrations diminuaient dès J3. Si aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les concentrations de granzyme B et les parasitémies et les pourcentages des sous-populations monocytaires, on remarque que celles de l'angiopoïétine-2 étaient associées aux parasitémies des patients du groupe CM Survie.

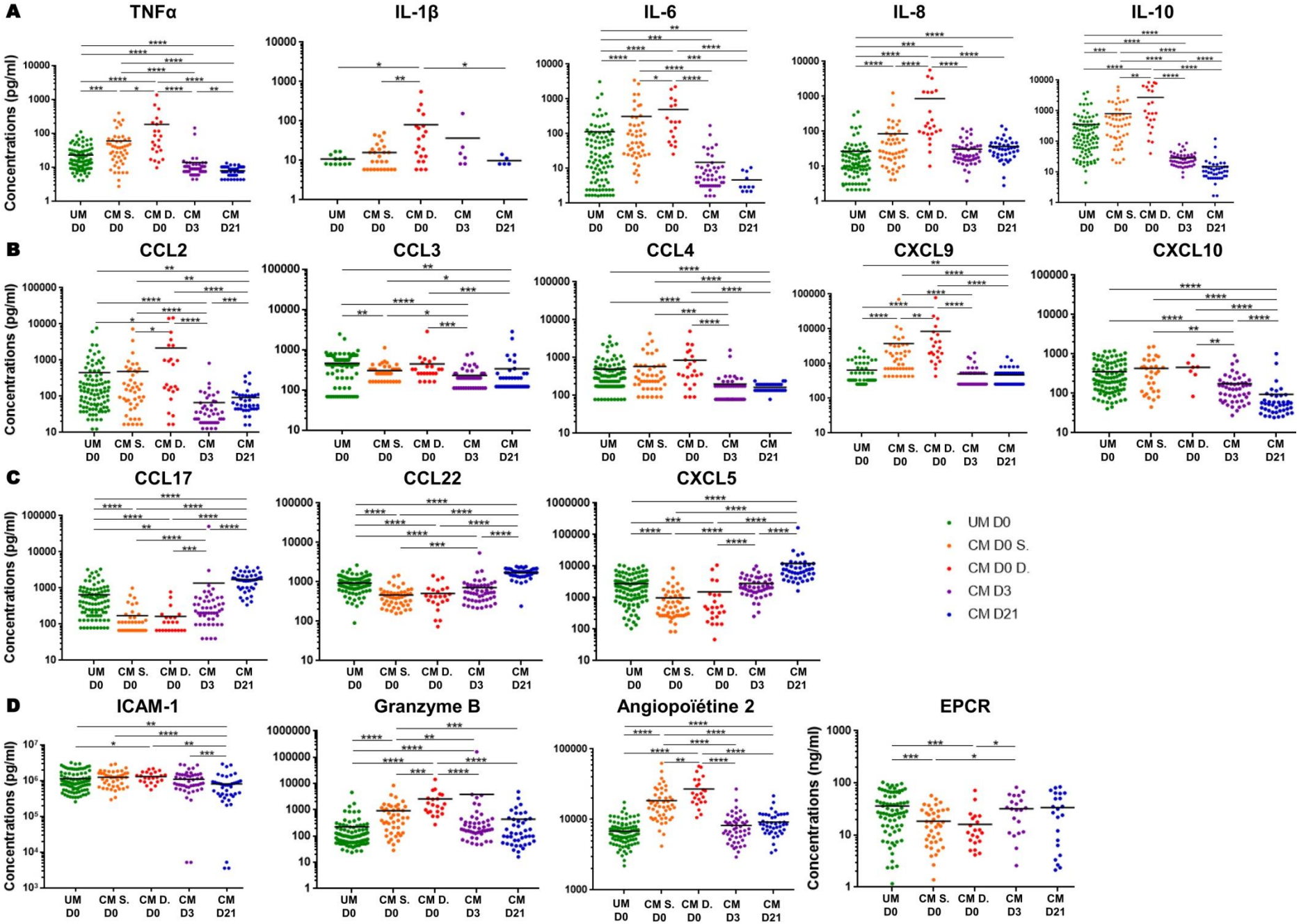

A
TNFα
IL-1β
IL-6
IL-8
IL-10
B
CCL2
CCL3
CCL4
CXCL9
CXCL10
C
CCL17
CCL22
CXCL5
D
ICAM-1
Granzyme B
Angiopoïétine 2
EPCR
Concentrations (pg/ml)
Concentrations (ng/ml)
UM D0
CM S. D0
CM D. D0
CM D3
CM D21
UM D0
CM D0 S.
CM D0 D.
CM D3
CM D21

Figure 34 : Concentrations de différents marqueurs pro/anti-inflammatoires présents dans le plasmas des patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM) : cytokines (A), chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites d'inflammation (B), chimiokines impliquées dans le recrutement des LTh2, LT régulateurs et neutrophiles (C), et autres marqueurs d'intérêt (D). Les concentrations ont été comparées en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. UM : uncomplicated malaria, CM : cerebral malaria, S. : survie, D. : décès.

Tableau 17 a et b : Corrélations entre les concentrations plasmatiques de différents marqueurs des réponses pro- et anti-inflammatoires et les parasitémies et pourcentages des sous-populations monocytaires des patients NEUROCM. Le test de corrélation de Spearman a été utilisé. La valeur rho et le degré de significativité sont présentées pour chaque corrélation identifiée. UM : uncomplicated malaria, CM : cerebral malaria.

	Parasitémie / concentrations plasmatiques		
	UM	**CM J0 Survie**	**CM J0 décès**
TNFα	**0.37 (p=0.0002 ***)**	**0.48 (p=0.0008 **)**	**0.70 (p=0.0004 ***)**
IL-1β	ns	ns	**0.68 (p=0.002 **)**
IL-6	**0.50 (p<0.0001 ****)**	**0.47 (p=0.001 **)**	**0.68 (p=0.003 **)**
IL-8	ns	**0.50 (p=0.0005 ***)**	**0.57 (p= 0.007 **)**
IL-10	**0.54 (p<0.0001 ****)**	**0.36 (p=0.015 *)**	**0.73 (p=0.0002 ***)**
CCL2	**0.24 (p=0.017 *)**	ns	**0.54 (p=0.011 *)**
CCL3	ns	**0.52 (p=0.0011 **)**	**0.54 (p=0.012 *)**
CCL4	**0.36 (p=0.0003 ***)**	**0.50 (p=0.0006 ***)**	**0.75 (p<0.0001 ****)**
CXCL9	ns	ns	ns
CXCL10	**0.33 (p=0.0008 ***)**	**0.45 (p=0.017 *)**	ns
CCL17	ns	ns	ns
CCL22	ns	**-0.34 (p=0.025*)**	ns
CXCL5	**-0.26 (p=0.009 **)**	ns	ns
ICAM-1	ns	**0.35 (p=0.026 *)**	**0.48 (p=0.027 *)**
Granzyme B	ns	ns	ns
Angiopoïétine 2	ns	**0.45 (p=0.002 **)**	ns
EPCR	ns	ns	ns

Pourcentages des sous-pop monocytaires / Concentrations plasmatiques									
	UM			CM J0 Survie			CM J0 décès		
	Class	**Interm**	**Non-Class**	**Class**	**Interm**	**Non-Class**	**Class**	**Interm**	**Non-Class**
TNFα	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-1β	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-8	ns	-0.46 (p=0.062)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
IL-10	ns	**-0.49 (p=0.041 *)**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CCL2	ns	**-0.54 (p=0.021 *)**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CCL3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CCL4	ns	**-0.53 (p=0.024 *)**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CXCL9	ns	ns	ns	**0.56 (p=0.027 *)**	-0.5 (p=0.060)	**-0.55 (p=0.035 *)**	ns	ns	ns
CXCL10	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**0.89 (p=0.033 *)**
CCL17	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CCL22	ns	ns	ns	ns	ns	**0.50 (p=0.045 *)**	ns	ns	ns
CXCL5	ns	ns	ns	ns	ns	**0.58 (p=0.016 *)**	ns	ns	ns
ICAM-1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Granzyme B	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Angiopoïétine 2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EPCR	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

III-3.4.5/ Dosages urinaires de différents marqueurs des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes

Pour finir, des dosages urinaires de différents marqueurs des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes ont été effectués par EIA. Les concentrations du 15-isoprostane F_{2t} (marqueur du stress oxydant), LTB4 (pro-inflammatoire), LXA4 (anti-inflammatoire), ainsi que celles des métabolites de la PGE2 appelés ici PGEM (pro-inflammatoire) et du glutathion réduit GSH (antioxydant) et oxydé GSSG (pro-oxydant), ont été mesurées dans les urines des patients UM (J0) et CM (J0, J3, J21). Les valeurs ont été normalisées par le dosage de la créatinine permettant de s'affranchir des biais liés aux variations de concentration des urines. Les concentrations des marqueurs étudiés sont présentées dans la figure 35 et leurs corrélations avec les parasitémies et les pourcentages des sous-populations monocytaires ont été rapportées dans le tableau 18 (a et b).

Pour l'ensemble des marqueurs mesurés (sauf les rapports GSSH/GSH et LXA4/LTB4), les profils des concentrations mesurées en fonction des groupes cliniques étaient similaires. En effet, les concentrations observées étaient plus faibles pour les groupes CM J0 Survie et Décès par rapport au groupe UM J0 et remontaient à J3 et J21 dans le groupe CM. Pour le rapport des concentrations de GSH/GSSG, il était similaire à J0 entre les groupes UM, CM Survie et CM Décès, et plus faible comparé aux valeurs obtenues à J3 puis J21 dans le groupe CM. En revanche, le rapport des concentrations de LXA4/LTB4 présente un profil assez inattendu avec un niveau plus élevé dans le groupe CM Survie comparé aux UM J0, mais plus faible pour les CM J0 Décès (comparé aux UM uniquement). A J3 et J21, les niveaux diminuent par rapport au groupe CM J0 Survie. De façon surprenante, les concentrations d'isoprostane, LTB4, GSSG mais également de LXA4 et GSH étaient toutes inversement corrélées aux parasitémies des patients du groupe UM et pour LTB4 à celles du groupe CM Décès. De plus, les pourcentages des monocytes intermédiaires étaient associés aux concentrations de LTB4 chez les patients UM. Enfin, les pourcentages des monocytes non-classiques étaient positivement corrélés aux concentrations de LXA4 et GSH pour le groupe UM.

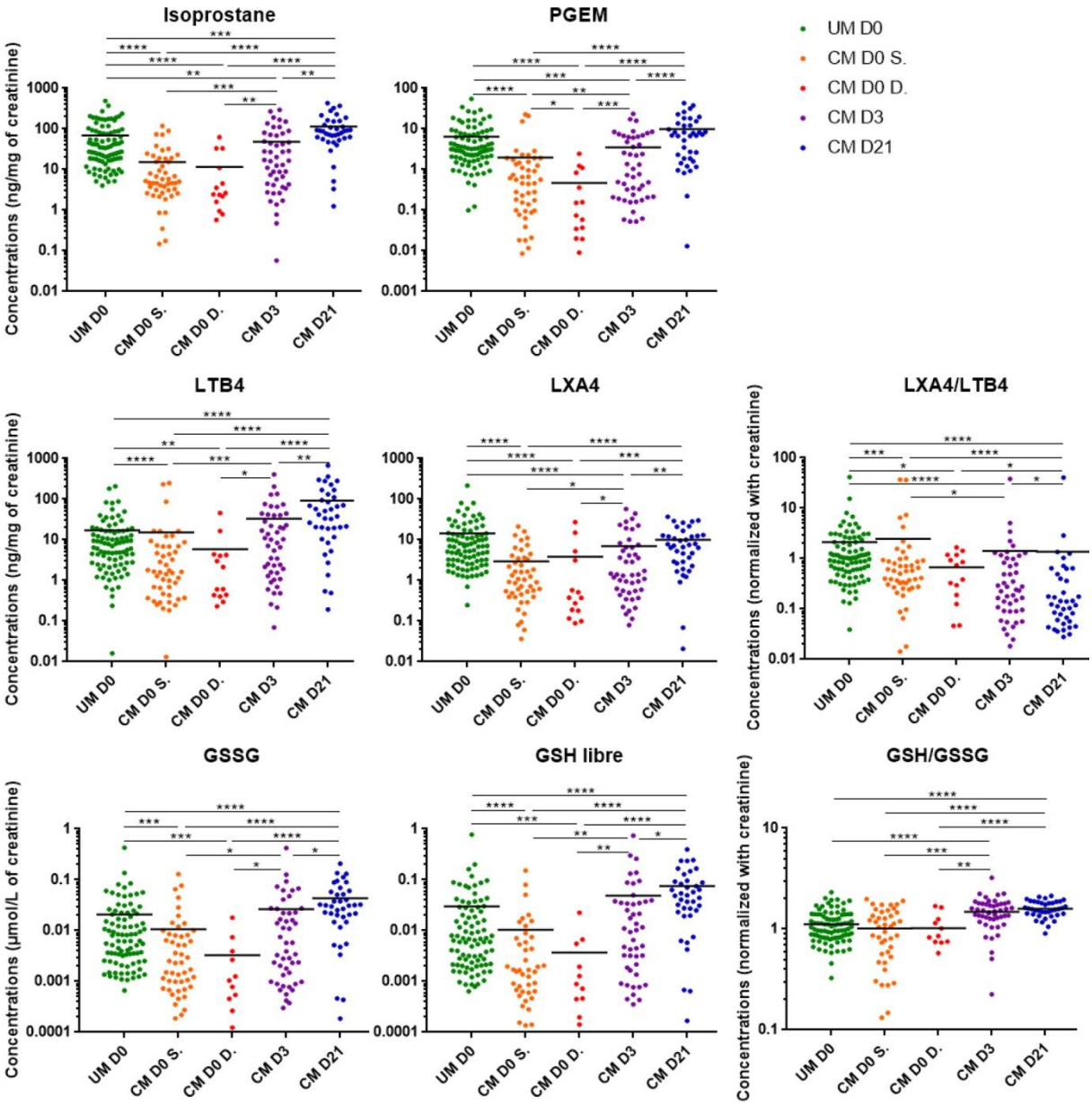


Figure 35 : Concentrations urinaires de différents marqueurs pro/anti-inflammatoires et oxydants chez les patients NEUROCM à J0 (UM, CM Survie/Décès), J3 et J21 (CM). Les concentrations ont été comparées en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. UM : uncomplicated malaria, CM : cerebral malaria, S. : survie, D. : décès.

Tableau 18 a et b : Corrélations entre les concentrations urinaires de différents marqueurs des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes et les parasitémies et pourcentages des sous-populations monocytaires des patients NEUROCM. Le test de corrélation de Spearman a été utilisé. La valeur rho et le degré de significativité sont présentés pour chaque corrélation identifiée. UM : uncomplicated malaria, CM : cerebral malaria.

	Parasitémie / concentrations urinaires		
	UM	**CM J0 Survie**	**CM J0 décès**
Isoprostane	**-0.44 (p<0.0001 ****)**	ns	ns
PGEM	ns	ns	ns
LTB4	**-0.28 (p=0.008 **)**	ns	**-0.57 (p=0.045 *)**
LXA4	**-0.37 p=0.0003 ***)**	ns	ns
GSSG	**-0.45 p<0.0001 ****)**	ns	ns
GSH	**-0.40 (p=0.0001 ***)**	ns	ns

Pourcentages des sous-pop monocytaires / Concentrations urinaires									
	UM			**CM J0 Survie**			**CM J0 décès**		
	Class	**Interm**	**Non-Class**	**Class**	**Interm**	**Non-Class**	**Class**	**Interm**	**Non-Class**
Isoprostane	ns	ns	0.50 (p=0.052)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PGEM	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LTB4	ns	**0.54 (p=0.028 *)**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LXA4	ns	ns	**0.52 (p=0.042 *)**	ns	-0.45 (p=0.056)	ns	ns	ns	ns
GSSG	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GSH	ns	ns	**0.51 (p=0.046 *)**	ns	ns	ns	ns	ns	ns

III-4. Discussion

Le projet NEUROCM avait pour objectif d'identifier les facteurs de l'hôte et du parasite à l'origine de la neuroinflammation et de sa résolution dans un contexte de paludisme cérébral. Pour ce faire, 170 enfants béninois atteints de paludisme non compliqué (n=97) et de neuropaludisme (n=73) ont été inclus dans l'étude au cours de l'année 2018. Un examen clinico-biologique complet a permis de fournir un diagnostic différentiel précis et de définir des groupes cliniques homogènes. Les prélèvements de sang, d'urine et de LCR au cours de la cinétique d'infection et de la résolution (J0, J3 et J21 post-inclusion) nous ont permis d'obtenir des informations majeures sur les mécanismes mis en jeu lors d'une infection palustre. Dans le cadre de ce projet, j'ai été en charge de l'analyse des différentes réponses immunitaires pro/anti-inflammatoires et oxydantes mises en œuvre chez les patients UM et CM au cours de l'infection et de la résolution de la neuroinflammation en me focalisant sur le rôle des populations monocytaires.

Les résultats précédemment obtenus lors de notre étude au Bénin en 2014/2016 et dans notre modèle murin d'ECM, basé sur des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* et traitées tardivement par la CQ, ont mis en évidence, entre autres, l'implication des monocytes non-classiques de la circulation périphérique dans la protection vis-à-vis du neuropaludisme et de l'expression de leur récepteur membranaire CD36. L'ensemble de ces résultats humains et murins nous ont permis de formuler des hypothèses qui ont été explorées à nouveau chez le patients au cours du projet NEUROCM. Ainsi, dans cette dernière étude, les données socio-démographiques et clinico-biologiques des patients ont été corrélées aux aspects immunologiques incluant l'analyse des cibles cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire de l'hôte au cours de l'inflammation et de sa résolution dans le sang périphérique (plasma, PBMC) et les urines des patients UM et CM.

Nous avons montré que les enfants atteints de neuropaludisme, majoritairement de sexe féminin (60%) étaient plus jeunes et présentaient un plus faible poids que les enfants atteints de paludisme non compliqué lors de leur inclusion respective dans l'étude. L'influence du sexe sur l'évolution de l'infection palustre est très peu documentée chez l'enfant. Si dans notre étude datant de 2014/2016, et comme dans d'autres publications (555) le sexe ne semble pas impacter le développement du neuropaludisme, il semblerait ici que le sexe féminin soit un facteur de sévérité palustre. De plus, avant leur prise en charge hospitalière dans le cadre de ce projet, les patients CM se sont présentés à plusieurs autres consultations de médecine « conventionnelle » et/ou traditionnelle (environ 90 et 40% respectivement). Ces forts

pourcentages mettent en évidence un défaut et/ou un retard de prise en charge adaptée, certainement dus à des problèmes de diagnostic ou de traitement, conduisant à une aggravation de la pathologie palustre. Des efforts sont encore à fournir pour faciliter l'accès aux soins des patients, mais également pour former les personnels soignants afin d'agir plus précocement et permettre une prise en charge plus rapide du patient. En effet, d'après les données déclaratives recueillies auprès des parents, environ 90% des enfants CM ont subis, avant leur arrivée à l'hôpital, au moins une phase de coma d'une durée moyenne de 1,2 jours, justifiant pour plus de 80% d'entre eux leur venue à l'hôpital. D'autres facteurs de gravité tels que l'apparition de convulsions ou une anémie sévère ont été observés chez ces enfants lors de leur inclusion dans l'étude. Leur parasitémie était également largement supérieure à celle des patients UM (90 000 versus 39 000/µl de sang), en accord avec les données de la littérature (556). Il est important de souligner que la parasitémie des enfants CM est très certainement sous-estimée car les formes matures des parasites sont séquestrés dans les organes profonds, particulièrement dans le cerveau. Enfin, les patients CM étaient caractérisés par une plus forte réponse immunitaire comparé aux enfants UM se traduisant par un nombre plus important de leucocytes, en particuliers de lymphocytes et polynucléaires neutrophiles. En revanche, et de façon surprenante, aucune différence n'a été observée entre les groupes UM et CM concernant le nombre de monocytes, qui reste même conforme aux valeurs de références décrites chez l'enfant sain.

Malgré ce résultat inattendu, et compte tenu de nos études précédentes, nous avons approfondi l'analyse des cellules monocytaires en commençant par une caractérisation phénotypique de chacune des 3 sous-populations par cytométrie en flux. Pour des questions de faisabilité, 5 groupes de 23 patients ont été constitués : « UM J0 », « CM J0 Survie », « CM J0 Décès », « CM J3 » et « CM J21 ». Ces derniers nous ont permis de comparer les résultats à J0 entre les deux formes cliniques de paludisme, d'identifier les différences entre les patients CM ayant survécus et ceux qui sont décédés et enfin d'établir une cinétique d'évolution de la réponse monocytaire au cours de la résolution de la neuroinflammation grâce à la comparaison des points J0-J3-J21 chez les mêmes enfants CM. L'analyse du pourcentage de monocytes classiques suggère que cette population cellulaire joue un rôle mineur dans l'établissement du neuropaludisme et dans la résolution de la neuroinflammation dans le sang périphérique des patients, bien qu'il soit corrélé à la densité parasitaire des enfants UM. En effet, le pourcentage des monocytes classiques ne variait pas en fonction de la sévérité palustre et de la résolution de l'infection comme cela avait déjà été souligné lors de notre

étude précédente en 2014/2016 entre les groupes UM et CM (458). En revanche, nous avions montré que le pourcentage de monocytes classiques était associé au décès des patients, résultat qui n'a pas été confirmé dans ce projet. De plus, le pourcentage de monocytes intermédiaires était nettement plus faible chez les enfants décédés du neuropaludisme comparé à celui des 4 autres groupes cliniques, suggérant un rôle protecteur des monocytes intermédiaires dans la survie des patients CM. Bien que ces résultats n'ont pas été démontrés dans nos études précédentes sur le patient et sur notre modèle murin d'ECM, ils vont dans le sens des travaux de Zhou *et al* qui ont démontré *in vitro* que les monocytes intermédiaires sont les plus efficaces dans la phagocytose opsonique des GRi par *P. falciparum via* leur récepteur CD16 (230). De plus, le pourcentage de monocytes non-classiques était plus faible dans les 2 groupes CM (Survie/Décès) par rapport au groupe UM à J0 en accord avec les résultats de notre étude 2014/2016, sans avoir d'incidence sur le devenir clinique des patients CM. Lors de notre étude précédente, en revanche, un faible pourcentage de monocytes non-classiques avait été associé au décès des patients. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle les monocytes non-classiques seraient impliqués dans la protection vis-à-vis du neuropaludisme. Le rôle protecteur des populations intermédiaires et non-classiques est supporté par la corrélation négative entre le pourcentage de ces sous-populations et la parasitémie des patients UM.

Concernant les marqueurs de surface étudiés par cytométrie en flux, une suppression de l'expression de CD14 à la surface des monocytes a été observée chez les patients décédés du neuropaludisme. L'expression de ce récepteur était plus élevée chez les patients UM par rapport au groupe CM Survie, dont l'expression était supérieure au groupe CM J21. Le CD14 possède deux fonctions principales : 1/ c'est un récepteur du LPS des bactéries et co-récepteur de TLR4. Sa reconnaissance des ligands microbiens conduit à la production de médiateurs pro-inflammatoires (TNFα, Il-1β, IFNγ) probablement *via* l'activation de la voie NfKB (557), 2/ il est impliqué dans la clairance des cellules apoptotiques (558). Dans un modèle murin d'ECM, une surexpression génique de CD14 a été observée dans les cerveaux des souris infectées (559). Cette surexpression pourrait être en lien avec l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques endothéliales et neuronales observée lors d'un ECM (560). De plus, Oakley *et al* ont mis en évidence un rôle délétère du récepteur CD14 dans un modèle murin d'ECM (561). Dans cette étude, la majorité des souris déficientes pour CD14 ne développaient pas d'ECM et avaient une parasitémie plus faible que les souris sauvages. Chez l'homme, une étude a également mis en évidence une augmentation des concentrations sériques de CD14 soluble au cours du paludisme grave, sans que ces dernières ne soient

corrélées à la parasitémie (562). Ces résultats vont à l'encontre de ceux observés dans notre étude chez les patients béninois suggérant l'importance de CD14 dans la cinétique de l'infection palustre et de sa résolution : un faible niveau d'expression de CD14 est associé au décès des patients, quand une forte expression semble traduire d'une capacité des monocytes à lutter contre la neuroinflammation et améliorer la résolution palustre, potentiellement en activant les voies pro-inflammatoires essentielles à l'élimination des parasites. De plus, tout comme CD14, une suppression de l'expression de CD16 à la surface des monocytes a été observée chez les patients décédés du neuropaludisme et une plus forte expression a été observée dans les groupes UM J0 et CM J21. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle le récepteur CD16 joue un rôle essentiel dans la résolution de la neuroinflammation et l'amélioration clinique des patients. Dans notre étude précédente, ce dernier avait déjà été associé au paludisme non compliqué et à la survie des patients (458). D'autres études indiquent que les monocytes intermédiaires, population exprimant majoritairement le récepteur CD16, semblent être la sous-population la plus impliquée dans la phagocytose opsonique des GRi par *Plasmodium* (229, 230). La diminution du pourcentage de cette population observée ici chez les enfants décédés du neuropaludisme pourrait ainsi expliquer en partie l'absence d'expression du CD16 dans ce groupe. De plus, une plus faible expression de HLA-DR a été observée à J0 chez les patients CM (Survie/Décès) par rapport aux 3 autres groupes cliniques, suggérant son implication dans la protection vis-à-vis du neuropaludisme, comme cela avait été mis en évidence dans notre précédente étude (458). D'autres travaux vont dans le sens de nos observations indiquant une diminution de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes chez des enfants atteints de paludisme grave et notamment du neuropaludisme (520, 521, 563). Cela suggère que *P. falciparum* a la capacité d'inhiber la présentation antigénique par les monocytes limitant ainsi la mise en place de l'immunité humorale.

Concernant CCR2 et CX3CR1, récepteurs impliqués dans la migration des monocytes et macrophages vers les sites inflammatoires, leur expression était largement plus élevée à J0 dans le groupe UM par rapport aux groupes CM (Survie/Décès), suggérant un rôle protecteur de ces 2 récepteurs vis-à-vis du neuropaludisme, ou un rôle positif dans le cas de paludisme simple. L'augmentation de l'expression de CX3CR1 à J3 et J21 dans le groupe CM, suggère que l'expression de CX3CR1, également impliqué dans la survie des populations monocytaires (564), est associée à une amélioration clinique des patients CM. En revanche, les monocytes des patients CM décédés présentaient une plus forte expression de CCR2 et CX3CR1 que les patients ayant survécus, suggérant un rôle délétère de l'expression de ces

récepteurs pendant le neuropaludisme. Dans notre étude de 2014/2016 chez le patient, une forte expression de ces deux récepteurs à la surface des monocytes avaient été associée au neuropaludisme et la surexpression génique de *CCR2* au décès des patients. Les pourcentages de monocytes non-classiques avaient également été inversement corrélés à l'expression génique de *CX3CR1* et *CCR2* suggérant là aussi un rôle délétère de ces deux récepteurs au cours du neuropaludisme. Ces résultats suggèrent qu'au cours d'un paludisme simple, le recrutement de monocytes/macrophages aux sites inflammatoires permet l'élimination des GRi et la résolution de l'infection. En revanche, au cours du neuropaludisme, la surexpression de ces récepteurs pourrait témoigner de l'emballement de la réponse inflammatoire devenue délétère et associée au décès.

Pour CD36, une inhibition de son expression à la surface des 3 sous-populations monocytaires a été observée dans les groupes UM et CM, accentuée lors d'un neuropaludisme, phénomène également observé lors de notre étude précédente en 2014/2016. Ces résultats soulignent l'importance du récepteur CD36 dans la lutte contre l'infection palustre et son rôle protecteur vis-à-vis du neuropaludisme (513). En effet, comme cela a déjà été discuté, CD36 possède de nombreuses fonctions lorsqu'il est exprimé à la surface des cellules monocytaires telles que la phagocytose non-opsonique des GRi et des parasites (81, 245, 247, 257–265), mais également l'élimination des cellules apoptotiques, lipoprotéines LDL oxydées (oxLDL) et autres débris (245, 247, 253, 266, 468, 469). Ainsi, la diminution de son expression à la surface des monocytes traduit une capacité limitée à promouvoir l'élimination de ces éléments inflammatoires, processus nécessaire à la résolution de l'inflammation palustre. De plus, son expression à la surface des monocytes classiques, principale population à exprimer ce récepteur selon les données de la littérature (207), était plus faible dans le groupe « Décès » par rapport au groupe « Survie » toujours en accord avec les résultats de notre étude précédente de 2014/2016. A l'inverse, une plus forte expression de CD36 a été observée chez les monocytes non-classiques des patients CM J0 Décès par rapport au groupe « Survie » et aucune différence n'a été déterminée sur les monocytes intermédiaires à J0 entre ces deux groupes cliniques. Son implication dans le devenir clinique des patients CM semble donc dépendre de la sous-population monocytaire qui l'exprime, avec un rôle bénéfique chez les monocytes classiques et potentiellement délétère chez les non-classiques, bien que ce résultat soit à minorer du fait de la faible expression de CD36 par la sous-population des monocytes non-classiques. De façon surprenante, très peu de résultats ont pu être déterminés pour le gène *CD36*. Une tendance vers une augmentation de son expression génique chez les patients décédés du neuropaludisme va à l'encontre des résultats observés lors de l'étude patients

2014/2016 et souligne une différence majeure entre les expressions protéique et génique de CD36 lors d'une infection palustre dans cette étude. L'expression génique de CD36 est régulée par les facteurs de transcription PPARγ et Nrf2. On observe une surexpression de *PPARγ*, lors d'un neuropaludisme par rapport au paludisme non compliqué, sans influencer le devenir clinique des patients CM. Sa nette augmentation à J3 peut en partie s'expliquer par le traitement à l'artésunate. Ainsi, l'expression génique de CD36 pourrait s'expliquer par les variations d'expression de *PPARγ*. Concernant Nrf2, son expression génique varie en fonction de la population monocytaire qui l'exprime. Son expression par les monocytes intermédiaires et non-classiques est plus faible en cas de neuropaludisme tout comme son expression par les monocytes classiques dans le groupe CM Décès par rapport aux patients ayant survécus, résultats en accord avec les données de notre modèle murin d'ECM. En revanche, on observe une surexpression de Nrf2 par les monocytes non-classiques chez les enfants décédés du neuropaludisme, ce qui va dans le sens de la surexpression de la protéine CD36 par ces mêmes cellules. L'expression par les 3 sous-populations monocytaires de *HMOX1*, gène codant pour l'HO-1, enzyme également sous le contrôle de Nrf2, est plus faible dans les groupes UM et CM à J0, comparé au groupe CM J21, mais serait également associée au décès des patients CM. Ce résultat est surprenant compte tenu de la variation d'expression de *Nrf2* chez les monocytes classiques et intermédiaires, mais va dans le sens de son expression par les monocytes non-classiques. Si HO-1 est souvent associée à la protection palustre (377), Nallandhighal *et al* confortent nos résultats en montrant que *HMOX1* et les niveaux plasmatiques d'HO-1 étaient surexprimés chez des enfants atteints de paludisme graves contrairement à *Nrf2* (122). De plus, l'induction de HO-1 lors d'un paludisme pourrait altérer les fonctions des neutrophiles accentuant la pathogénicité palustre (565).

Concernant CD163, son expression était augmentée dans les groupes UM et CM à J0 sans distinction entre ces groupes. Ce résultat suggère un rôle délétère de CD163 à la surface des monocytes lors d'un paludisme. D'autres études ont déjà mis en évidence une corrélation entre les niveaux d'expression des formes soluble et membranaire du CD163 et la sévérité palustre chez des enfants tanzaniens (352). Les résultats obtenus dans notre modèle murin d'ECM vont également dans ce sens. Avec ses propriétés antioxydantes, on pourrait penser que le CD163 est capable de bloquer les mécanismes pro-oxydatifs des monocytes/macrophages, comme la production de ROS, mécanisme essentiel pour la destruction des GRi par *P. falciparum* et la lutte contre l'infection palustre. Son rôle potentiellement délétère au cours d'un paludisme souligne l'importance de la réponse oxydante en réponse à l'infection. A l'inverse, l'expression génique de CD163 par les

monocytes classiques et intermédiaires est plus faible chez les patients décédés du neuropaludisme par rapport au groupe CM Survie. L'hypothèse d'un rôle délétère de CD163 émise à la suite de l'analyse de son expression protéique n'est pas vérifiée par la mesure de son expression génique, soulignant une différence entre les expressions protéique et génique de CD163 lors d'une infection palustre et le rôle complexe de la balance pro/antioxydante.

L'analyse de l'expression de *HIF-1α* à J0 au cours de l'infection palustre ne semble pas très concluante, comme cela avait été le cas dans notre modèle murin d'ECM, et va dans le sens des résultats de Medana *et al*, n'observant pas non plus de modification de l'expression de ce gène par les macrophages lors de biopsies cérébrales de patients décédés de neuropaludisme (524). En revanche, une tendance à l'augmentation de son expression génique lors de la résolution de l'inflammation à J3/J21 traduit son potentiel rôle protecteur. En effet, HIF-1α serait essentiel à la survie et l'efficacité des fonctions macrophagiques en condition inflammatoire, son inhibition entrainerait, entre autre, une altération des capacités phagocytaires des monocytes/macrophages (240).

L'analyse des expressions géniques de *COX-2* et *ALOX15* chez le patient est en contradiction avec celle obtenue dans notre modèle murin d'ECM. Chez la souris, une nette inhibition de l'expression de ces deux gènes avait été mise en évidence au cours du paludisme cérébral pour les 3 sous-populations monocytaires. A l'inverse, chez l'homme, on observe une plus forte expression d'*ALOX15* par les monocytes classiques au cours d'un neuropaludisme sans impacter le devenir clinique des patients CM, ainsi qu'une plus forte expression de *COX-2* par la même sous-population dans le groupe CM J0 Survie comparée aux 4 autres groupes cliniques. Chez les monocytes intermédiaires et non-classiques, l'analyse des expressions géniques de *COX-2* et d'*ALOX15* n'a pas mis en évidence de résultats pertinents quant à leur implication dans la pathologie palustre. De même, aucun résultat n'a pu être retenu suite à l'analyse de l'expression des gènes codant pour la 5-LOX et la 12-LOX suggérant que l'activation de la voie des cyclooxygénases par les monocytes est dépendante de la sous-population en question et ne semble impliquer qu'une partie des enzymes. La 15-LOX possède des propriétés à la fois pro- et anti-inflammatoires en fonction des pathologies dans lesquelles elle est impliquée. Bien que son expression semble être favorable à la résolution de l'inflammation, une activité excessive pourrait conduire à un emballement des réponses pro-inflammatoires avec la production incontrôlée de cytokines et chimiokines ainsi que de ROS (537, 566), comme c'est peut être le cas chez les enfants atteints de neuropaludisme dans notre étude.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'expression de *NOX2* et *NCF1*, 2 gènes codant respectivement pour la NOX2 et la p47phox, composant la NADPH oxydase, enzyme responsable de la production de ROS. Une expression plus faible de *NOX2* par les monocytes classiques et intermédiaires a été observée à J0 chez les patients UM et CM J0 (Survie/Décès) comparés aux groupes CM J3/J21, contrairement à son expression par les monocytes non-classique qui était plus faible chez les patients atteints de paludisme non compliqué par rapport aux groupes CM J0 Survie, J3/J21. Cependant, ce dernier résultat a été obtenu avec peu de patients. Ces résultats suggèrent un rôle de *NOX2* dans l'amélioration clinique des patients CM à partir de J3 lorsqu'il est exprimé par les monocytes classiques et intermédiaires. Ces deux populations sont connues pour être les principales populations impliquées dans la production de ROS contrairement aux monocytes non-classiques qui en produisent pas ou très peu (207, 208). Cette production de ROS par les monocytes classiques et intermédiaires est en partie due à la NADPH oxydase dont NOX2 en est la sous-unité principale. Une diminution de l'expression de NOX2 par ces 2 sous-populations monocytaires traduit donc d'une diminution de la production de ROS chez les patients atteints de paludisme à J0. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle les réponses pro-oxydantes, et notamment la production de ROS par les monocytes, semble jouer un rôle essentiel dans la résolution de cette infection. Pour *NCF1*, autre constituant de la NADPH oxydase, on observe un niveau d'expression plus élevé pour les CM Survie à J0 comparé aux UM par les monocytes classiques, avec des niveaux similaires entre les groupes CM J0 Survie, Décès et CM J3. A J21, le niveau baissait pour être à celui des UM. Ces résultats une surexpression de *NCF1* au cours du neuropaludisme. Ces résultats sont innatendus étant donnés les résultats obtenus pour *NOX2*. Cependant, la fonctionnalité de la NADPH oxydase reposant sur la translocation à la membrane et la phosphorylation de la p47phox (codée par *NCF1*), le niveau d'expression de *NCF1* n'est peut être pas révélateur de l'activation de l'enzyme (567).

Afin de mieux comprendre l'impact de la production de ROS sur l'évolution de la pathologie palustre, nous avons déterminés, dans chacun des groupes cliniques, la capacité des monocytes à induire la production de ROS. Les résultats ont montré que cette dernière était nettement inhibée lors d'un neuropaludisme, particulièrement chez les patients décédés. La prise d'artésunate, traitement pro-oxydant, ne devrait pas influencer ce phénomène. En revanche, son augmentation tardive à J21 traduit son rôle essentiel dans la résolution tardive de la pathologie palustre.

Pour compléter ces résultats, des dosages plasmatiques de nombreux marqueurs pro- et anti-inflammatoires ont été effectués sur l'ensemble des patients inclus dans l'étude. A J0, les concentrations des cytokines pro- et anti-inflammatoires étudiées (TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8 et IL-10) étaient supérieures lors d'un neuropaludisme comparées au groupe UM, comme c'était le cas lors de notre étude en 2014/2016 pour IL-1β, IL-6 et IL-10 et comme nous l'avions également identifié dans notre modèle murin d'ECM lors de l'analyse de ces mêmes cytokines. De plus, ces valeurs diminuaient à J3 et J21 avec la résolution de la neuroinflammation. Les concentrations de ces cytokines étaient également toutes associées au décès des patients, comme c'était également le cas dans notre étude précédente pour IL-1β, IL-6 et IL-10. De façon globale, les concentrations des cytokines étudiées étaient positivement corrélées aux parasitémies des enfants et celles de l'IL-10 inversement corrélées au pourcentage de monocytes intermédiaires chez les patients UM soulignant l'implication de cette sous-population dans les mécanismes pro-inflammatoires des monocytes dans le but d'éliminer *Plasmodium*. L'importance des cytokines et leur rôle majeur dans la physiopathologie du neuropaludisme a été de nombreuses fois discuté dans la littérature (568). Une augmentation de leurs concentrations a souvent été associée à l'infection palustre et au neuropaludisme comme c'est le cas dans notre étude (120, 150, 152–156, 186, 314, 323, 324, 458, 520, 568).

Concernant les chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites inflammatoires (CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9, CXCL10), de plus fortes concentrations ont été obtenues à J0 dans les groupes UM et CM Survie/Décès comparées à celles des groupes CM J3 et J21, tendance également retrouvée dans nos résultats issus de notre modèle murin d'ECM et dans d'autres articles chez l'homme et chez la souris (120, 124–127, 324, 327–331, 334, 568). De plus fortes concentrations de CXCL9 ont également été observées à J0 lors d'un neuropaludisme par rapport au groupe UM et étaient associées au décès des patients CM, comme celles de CCL2. Les concentrations de CXCL9 étaient également positivement corrélées aux pourcentages des monocytes classiques et inversement corrélées à ceux des monocytes non-classiques dans le groupe CM Survie à J0, suggérant qu'à ce stade de l'infection, les monocytes classiques sont la principale population monocytaire produisant la chimiokine CXCL9 associée au décès des patients, contrairement aux monocytes non-classiques. En revanche, les pourcentages de monocytes non-classiques étaient positivement corrélés aux concentrations de CXCL10 dans le groupe CM Décès. Dans la littérature, CXCL9 et CXCL10 sont 2 chimiokines très souvent associées à la sévérité palustre voire au décès des patients atteints de neuropaludisme (118, 124–127, 329–331, 334).

Si dans nos travaux cette notion s'est avérée exacte pour CXCL9, les concentrations de CXCL10 ne se sont quant à elles pas révélées discriminantes à J0 entre les groupes UM et CM (Survie/Décès). En revanche, pour CCL3, les concentrations étaient plus faibles chez les patients CM Survie par rapport au groupe UM. Jusqu'à présent, aucune étude n'a mis en évidence le rôle précis de CCL3 au cours d'une infection palustre. Des travaux menés par l'équipe de Olszewki *et al* ont montré que l'expression de CCL3 était nécessaire pour protéger les souris des dommages cérébraux lors d'une infection par Cryptococcus neoformans (569), suggérant un potentiel rôle neuroprotecteur de cette chimiokine au cours de l'infection.

Pour les chimiokines impliquées dans le recrutement des LTh2 et LTreg (CCL17 et CCL22) et neutrophiles (CXCL5) vers les sites d'inflammation, on observe une nette baisse de leur concentration au cours d'une infection palustre, principalement lors d'un neuropaludisme mais sans différence entre le devenir clinique des patients (Survie/Décès). Cette tendance avait déjà été rapportée précédemment lors de l'analyse de ces mêmes chimiokines dans notre modèle murin d'ECM, mais ce résultat n'a encore jamais été évoqué dans la littérature pour CCL17 et CCL22. Seule l'équipe de Che *et al* a montré une diminution des concentrations plasmatiques de CXCL5 chez des enfants atteints de paludisme non compliqué comparée à des enfants sains (570). Alferink *et al* ont quant à eux mis en évidence un rôle potentiellement protecteur de CCL17 dans un modèle murin d'ECM (549). La diminution de CCL17 et CCL22 au cours d'un neuropaludisme dans notre étude pourrait traduire un défaut dans la mise en place des réponses régulatrices. Le rôle de ces dernières au cours de l'infection palustre est encore discuté. Si elles semblent parfois nécessaires au contrôle de l'infection, (549, 550), d'autres études suggèrent un rôle délétère en limitant le développement d'une réponse pro-inflammatoire indispensable au contrôle de l'infection (551). De plus, certaines de ces chimiokines ont été inversement corrélées aux parasitémies des patients. Enfin, les pourcentages des monocytes non-classiques ont été positivement corrélés aux concentrations de CCL22 et CXCL5 pour le groupe CM Survie, consolidant l'hypothèse d'un rôle pro-résolutif de cette population monocytaire lors d'un neuropaludisme.

Concernant les autres médiateurs plasmatiques, les concentrations d'ICAM-1 étaient plus élevées dans les groupes UM et CM (Survie/Décès) à J0 par rapport à J21, et légèrement supérieures chez les patients décédés du neuropaludisme par rapport au groupe UM. Les concentrations de ce marqueur étaient également positivement corrélées aux parasitémies des groupes CM J0 (Survie/Décès). Dans le même sens, de fortes concentrations de Granzyme B et d'angiopoïétine-2 ont été observées au cours d'un neuropaludisme à J0 et étaient associées

au décès des patients CM. Les concentrations d'angiopoïétine-2 étaient également associées aux parasitémies des patients du groupe CM Survie, suggérant là aussi un rôle délétère de ce marqueur. A l'inverse, de plus faibles concentrations plasmatiques d'EPCR ont été obtenues lors d'un neuropaludisme, comparées à celles des groupes UM et CM J3. Dans la littérature, des concentrations élevées d'ICAM-1 (571–575) et d'angiopoïétine-2 (572–582) ont déjà été observées dans les plasmas d'enfants atteints de neuropaludisme comparé à des enfants sains ou atteints de paludisme non compliqué et ont également été associées au décès des patients. L'angiopoïétine-2 et ICAM-1 sont des marqueurs d'activation des cellules endothéliales. En effet, ICAM-1 est un récepteur privilégié par les GRi pour leur adhésion à l'endothélium vasculaire cérébral (287, 394, 583), bien que les travaux récents menés sur des isolats parasitaires issus de la cohorte NEUROCM montrent que les parasites des patients CM ne cytoadhèrent pas plus à ICAM-1 que les parasites provenant des patients UM (584). L'angiopoïétine-1 et son récepteur Tie-2, présent à la surface des cellules endothéliales, ont un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie endothéliale. En se liant à Tie-2, l'angiopoïétine-2, antagonise les effets protecteurs de l'angiopoïétine-1 et active ces cellules les rendant plus sensibles à différents signaux pro-inflammatoires, notamment aux cytokines et chimiokines, fragilisant ainsi la BHE (572). Il n'est donc pas surprenant d'observer une augmentation des concentrations d'ICAM-1 et d'angiopoïétine-2 au cours d'un neuropaludisme, d'autant plus que l'angiopoïétine-2 régule positivement l'expression d'ICAM-1 (585). En revanche, de fortes quantités d'ICAM-1 plasmatiques ne traduisent pas forcément une augmentation de son expression à la surface des cellules endothéliales. Cette problématique a été résolue par les travaux de Armah *et al* montrant une augmentation de l'expression d'ICAM-1 par les cellules endothéliales dans les cerveaux de patients décédés du neuropaludisme (586, 587). Pour l'angiopoïétin-2, Prapansilp *et al* ont montré que sa concentration plasmatique était associée à différents critères de sévérité palustre (anémie, ictère, hypoglycémie, insuffisance rénale aiguë) et au décès des patients atteints de paludisme grave, sans discriminer les patients CM (581). Dans cette même étude, aucune différence d'expression n'a été observée pour l'angiopoïétine-2 et son récepteur Tie-2 dans les cerveaux des patients décés de neuropaludisme et ceux décédés d'autres formes cliniques de paludisme grave, et aucune corrélation n'a été obtenue entre leurs niveaux d'expression et la séquestration des GRi dans le cerveau. En revanche, les taux d'angiopoïétine-2 dans les neurones des patients décédés étaient associés au nombre d'hémorragies cérébrales observées. L'EPCR est également un récepteur impliqué dans la séquestration des GRi dans les micro-vaisseaux cérébraux (588–593), et cela a été confirmé dans l'étude NEUROCM (584). Les

GRi vont exprimer à leur surface l'antigène parasitaire P*f*EMP1 qui va se lier à l'EPCR au niveau du domaine DC8. Des travaux ont permis d'associer le DC8 à la gravité palustre et au neuropaludisme chez l'enfant (40, 593–595). Contrairement à nos résultats, une étude également menée au Bénin sur des enfants atteints de différentes formes cliniques de paludisme a montré une augmentation des concentrations plasmatiques d'EPCR chez les patients CM et principalement chez ceux décédés du neuropaludisme (596). Cette incohérence de résultats entre nos deux études, malgré une méthodologie similaire, suggère soit un défaut méthodologique dans l'un ou l'autre étude, soit une disparité des sujets CM étudiés. Leurs résultats indiquent qu'un âge plus élevé et la prise d'antibiotiques avant l'inclusion étaient associés à des concentrations plus fortes d'EPCR plasmatiques. Pour l'étude NEUROCM, l'analyse des données cliniques révèle une très forte homogénéité de nos patients CM, ce qui renforce nos résultats. Par ailleurs, ce récepteur a également des propriétés anticoagulantes essentielles dans la régulation de l'homéostasie tissulaire en participant au contrôle de la coagulation et de la neuroinflammation (597). Ainsi, Moxon *et al* ont mis en évidence une réduction de l'expression de l'EPCR à la surface de l'endothélium cérébral lors d'autopsies d'enfants décédés du neuropaludisme ainsi qu'une diminution des concentrations plasmatiques d'EPCR, comme cela était le cas dans notre étude (598). De plus, il semblerait qu'une augmentation de l'EPCR soluble puisse être associée à une altération de la cytoadhérence des GRi à l'endothélium cérébral permettant ainsi de prévenir les dommages dus à la séquestration des cellules dans le cerveau (599). D'autres études vont dans le sens de nos observations en ne montrant aucune association entre la sévérité palustre et les niveaux plasmatiques d'EPCR soluble (600). Chez la souris, le granzyme B est produit par les LT CD8 cytotoxiques et participe à la destruction des cellules endothéliales formant la BHE conduisant à la pathogénicité du paludisme cérébral murin (124). Chez l'homme, l'implication délétère des LT CD8 cytotoxiques dans le neuropaludisme a longtemps été discutée, tout comme le rôle du granzyme B. Très récemment, deux études ont mis en évidence l'implication de ces cellules immunitaires dans la physiopathologie du neuropaludisme chez l'homme et leur localisation au niveau du cerveau a été confirmée chez des enfants malawites décédés du neuropaludisme (464, 486). De plus, Kaminski *et al* ont observé une plus forte concentration plasmatique de granzyme B chez les enfants lors d'une infection palustre comparé à des patients sains, ainsi qu'une augmentation du pourcentage de LT CD8+/GrzB+ dans le sang des patients atteints de paludisme grave (601). L'ensemble de ces études vont dans le sens de nos résultats, suggérant un rôle délétère du granzyme B et des LT CD8+ qui le produisent au cours du neuropaludisme chez l'homme.

Pour finir, nous avons dosé dans les urines des patients, différents marqueurs des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes. De façon générale, les concentrations d'isoprostane, LTB4, LXA4, GSSG et GSH étaient diminuées lors d'un neuropaludisme, sans différence entre le devenir clinique des patients CM (Survie/Décès), et ces concentrations augmentaient à J3 et J21 avec la résolution palustre. L'isoprostane est produit lors de la peroxydation lipidique de l'acide arachidonique et est un marqueur du stress oxydant (602). La diminution de ses concentrations urinaires suggère un défaut des réponses pro-oxydantes chez les patients CM, associées à la sévérité palustre. En revanche, ses concentrations étaient positivement corrélées à la parasitémie des patients UM, soulignant ici un potentiel rôle délétère. Contrairement à nos résultats, une étude portant sur des adultes atteints de paludisme grave avec atteinte rénale a montré que les concentrations plasmatiques d'isoprostane étaient associées à la sévérité palustre et au décès des patients suggérant que les dommages oxydatifs contribuent à la pathogénicité palustre (603). Dans le même sens, une augmentation des niveaux d'isoprostane a été observée dans les cerveaux des souris infectées dans un modèle d'ECM (604). Cependant, nos résultats sur la capacité moindre des monocytes de patients CM à produire des ROS renforcent notre résultat sur l'isoprostane et l'idée générale qu'un défaut de réponse pro-oxydante pourrait être délétère pour la résolution du neuropaludisme.

Dans notre étude, nous nous sommes ensuite intéressés aux concentrations urinaires de LTB4 et de LXA4. La première est une molécule pro-inflammatoire, produite par les cellules phagocytaires et favorise la perméabilité vasculaire et la migration des leucocytes. La seconde, dont nous avons déjà parlé, possède des propriétés anti-inflammatoires permettant d'inhiber les réponses pro-inflammatoires des cellules immunitaires, notamment la cytotoxicité des cellules NK. La diminution de leurs concentrations urinaires lors d'un neuropaludisme met en évidence un potentiel défaut de la voie de métabolisation de l'acide arachidonique, et notamment de la 5-LOX enzyme essentielle à la production de LTB4 et LXA4, comme cela avait été rapporté dans un modèle murin de neuroinflammation (545). Le ratio LXA4/LTB4 est supérieur chez les patients UM et CM ayant survécu et inférieur dans le groupe CM Décès comparé à au groupe CM J21, sans qu'une différence ne soit observée entre le devenir des patients CM (Survie/Décès). Ce nouveau résultat suggère le rôle bénéfique de LXA4 et délétère de LTB4 dans la pathogénicité palustre. Des études viennent confirmer cette hypothèse. En effet, dans un modèle murin d'ECM, les souris présentant des symptômes cliniques de neuropaludisme avaient des concentrations sériques de LTB4 plus élevées que les souris non infectées suggérant là aussi un rôle délétère de LTB4 au cours du paludisme cérébral (526). Toujours dans un modèle murin d'ECM, LXA4 semble jouer un

rôle protecteur contre le neuropaludisme en activant les réponses antioxydantes (HO-1) et en limitant l'activation des cellules endothéliales par l'inhibition de l'expression d'ICAM-1 (543). Dans ce même modèle, il a été montré que LXA4, produit de façon endogène, protège les souris contre le paludisme cérébral en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFNγ ou l'IL-12 ainsi que la migration des cellules immunitaires dans le cerveau des souris infectées (148). Dans cette même étude, l'administration de LXA4 aux souris était associée à une diminution de la mortalité des souris et permettait de limiter les réponses pro-inflammatoires. Dans notre étude, les concentrations de LTB4 et LXA4 étaient respectivement corrélées aux pourcentages de monocytes intermédiaires et non-classiques chez les patients UM, suggérant que lors d'un paludisme non compliqué, les monocytes intermédiaires produisaient majoritairement le LTB4 et les monocytes non-classiques le LXA4. Ce résultat va dans le sens de la littérature indiquant un rôle plutôt pro-inflammatoire des monocytes intermédiaires et résolutif des non-classiques.

Par ailleurs, les concentrations urinaires de GSH (forme réduite, antioxydante) et GSSG (forme oxydée, pro-oxydante) étaient toutes les deux plus faibles lors d'un neuropaludisme (CM J0) et le ratio GSH/GSSG l'était également pour les paludismes simples et les neuropaludisme à J0 par rapport aux groupes CM J3 et J21, sans différence entre les groupes CM Survie/Décès. La voie du glutathion est un des mécanismes antioxydants le plus puissant de l'organisme et le ratio GSH/GSSG, autour de 10:1 voire 100:1 dans des conditions saines, est souvent utilisé comme marqueur du stress oxydant car directement corrélé au niveau de ROS produits par les cellules (605, 606). Dans notre étude, le ratio était autour de 1:1 à J0 pour les UM et le CM, puis montait à environ 3:1 à J3 et J21, ce qui signe une réponse pro-oxydante nette dans les groupes paludisme UM et CM, qui évolue dès J3 vers une réponse plus antioxydante. Comme cela a déjà été discuté, le système du glutathion est en partie responsable de la dégradation des ROS produits lors d'une infection palustre. De plus, les réponses pro-inflammatoires et notamment la sécrétion de TNFα, peuvent induire un stress oxydant en modulant le métabolisme du glutathion, en favorisant la synthèse de GSSG en dépit du GSH (365, 366). En effet, l'administration de TNFα à des rats entraine une diminution des niveaux de glutathion total, alors que les LT $CD8^+$ et $CD4^+$ de la rate présentaient une augmentation significative de GSSG (607), suggérant une augmentation du stress oxydant. D'autres études ont mis en évidence une modification de la voie du glutathion sur des modèles murins d'ECM (608–610), avec notamment une diminution du glutathion total (609, 610) ainsi que de sa forme réduite (GSH) (609) dans le cerveau des souris infectées, observée dès J4, avant l'apparition des symptômes cliniques (609). Dans notre

étude, le faible ratio de GSH/GSSG lors d'une infection palustre est le témoin d'un stress oxydant et va dans le sens des résultats des travaux précédents. Les concentrations de GSH ont été corrélées aux pourcentages de monocytes non-classiques des patients UM, et celles de GSSG inversement corrélées aux densités parasitaires de ce même groupe clinique, tout comme celles de GSH. La corrélation négative GSSG/parasitémie semble logique puisque les ROS sont un élémet important de l'élimination des GRi, en revanche, pour le GSH, ce résultat est moins clair.

Pour finir, les concentrations de PGEM étaient plus faibles lors d'un neuropaludisme et étaient associées à la survie des patients CM. Ces résultats suggèrent que la PGE2 et ses métabolites pourraient jouer un rôle protecteur dans l'amélioration clinique et la survie des patients. Des résultats similaires ont été rapportés par l'équipe d'Anyona *et al* indiquant que les concentrations plasmatiques et urinaires de PGEM étaient plus faibles chez des enfants atteints d'anémie sévère palustre par rapport au groupe UM et avaient été associées au taux d'Hb des patients (530). Dans le même sens, Perkins *et al* ont montré que des enfants atteints de neuropaludisme avaient des concentrations urinaires de PGE2 plus faibles que les patients UM, sans que ces dernières soient corrélées à la parasitémie ou au taux d'Hb (533). Enfin, l'inhibition de la PGE2, induite en partie par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et la phagocytose de l'hémozoïne par les monocytes (531, 532), a été associée à une production excessive de TNFα, une diminution de l'érythropoïèse et à l'aggravation de l'anémie palustre (530, 531).

III-5. Conclusion

Cette nouvelle cohorte de patients béninois atteints de différentes formes cliniques de paludisme nous a permis d'identifier de nouveaux marqueurs spécifiques du neuropaludisme et ceux liés au décès des patients.

Ainsi, en comparant les résultats à J0 des enfants CM (Survie/Décès) versus UM, certains facteurs de sévérité palustre ont été mis en évidence. Les enfants atteints de neuropaludisme présentaient de plus fortes concentrations plasmatiques de TNFα, IL-6, IL-8, IL-10, CXCL9, granzyme B et d'angiopoïétine-2 et de plus faibles concentrations de CCL17, CCL22, CXCL5 et d'EPCR ainsi que des concentrations urinaires plus faibles d'isoprostane, PGEM, LTB4, LXA4, GSH et GSSG. Au cours du neuropaludisme, une capacité réduite des monocytes à induire la production de ROS a été observée ainsi qu'une expression diminuée de HLA-DR, CCR2 et CX3CR1 à la surface des 3 sous-populations monocytaires. De plus, un plus faible pourcentage de monocytes non-classiques a été obtenu chez les patients CM à J0 comparé aux UM suggérant un rôle protecteur de cette population face au neuropaludisme. Dans ces mêmes groupes, les monocytes classiques présentaient quant à eux une faible expression de CD14 et CD36 et une forte expression génique de HO-1, alors que les monocytes intermédiaires présentaient une plus faible expression des récepteurs CD16 et CD36 par rapport aux patients UM.

Parmi les enfants atteints de neuropaludisme, la comparaison des marqueurs étudiés à J0 entre les groupes « Survie » et « Décès » nous a permis de mettre en évidence des facteurs de risque associés au décès des patients CM. Ainsi, les enfants décédés du neuropaludisme présentaient de plus fortes concentrations plasmatiques de TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, CXCL9, granzyme B et d'angiopoïétine-2 et une plus faible concentration urinaire de PGEM. Une réduction de la capacité de production des ROS par les monocytes a également été observée chez ces patients, associée à une plus forte expression de CCR2 et une plus faible expression de CD14 et CD16 à la surface des 3 sous-populations monocytaires, soulignant le rôle protecteur de ces deux derniers marqueurs dans la survie des patients CM. Une forte expression génique de HO-1 a également été mise en évidence sur l'ensemble des monocytes. De plus, un plus faible pourcentage de monocytes intermédiaires a été rapporté, associé à une plus faible expression génique de CD163 suggérant ici un rôle protecteur de cette population et de ce marqueur face au décès dû au neuropaludisme. Les monocytes classiques présentaient quant à eux une forte expression de CX3CR1 et une faible expression de CD36 ainsi que des gènes *Nrf2, COX-2* et *CD163*. A l'inverse, les monocytes non-classiques présentaient une plus

forte expression de CD36 et de *Nrf2* ainsi qu'une plus forte expression de CX3CR1. Cependant, les résultats d'expression génique des sous-populations monocytaires sont à analyser avec prudence, compte tenu du faible nombre de données obtenues.

L'ensemble de ces résultats met à nouveau en évidence l'importance de la balance entre les réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes au cours du neuropaludisme et le rôle essentiel des sous-populations monocytaires dans la lutte contre l'infection. Il semblerait que la réponse oxydative orchestrée par les monocytes constitue une étape nécessaire à la résolution de la neuroinflammation en participant à l'élimination des GRi et la lutte contre l'infection palustre. L'issue favorable de la pathologie repose probablement sur un basculement vers une réponse anti-inflammatoire et résolutive après une étape oxydative. Une meilleure compréhension de la cinétique de régulation des voies pro/anti-inflammatoires et oxydantes par les monocytes/macrophages au cours du neuropaludisme nous permettra de mettre en place une stratégie de prise en charge et de traitement mieux adaptée au patient et à sa cinétique d'infection.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En 2021, le paludisme reste un problème majeur de santé publique. L'infection à *P. falciparum* est responsable de la plus grande majorité des paludismes graves et des décès dans le monde, principalement en Afrique sub-saharienne. Même correctement traité, un neuropaludisme peut conduire à des séquelles neurologiques dans 4 à 20% des cas. Il est essentiel de bien connaitre le tableau clinico-biologique du neuropaludisme afin d'effectuer un diagnostic et une prise en charge rapide et efficace du patient. L'artésunate IV est actuellement le médicament de référence pour le traitement du neuropaludisme chez l'adulte et l'enfant. Cependant, la prévention joue un rôle majeur dans la lutte contre le paludisme (moustiquaires imprégnées, pulvérisation d'insecticides, chimioprophylaxie). Le défi majeur de ces dernières années est l'émergence de résistances aux dernières molécules antipaludiques efficaces (dérivés de l'artémisinine), notamment en Asie du Sud-est.

La physiopathologie du neuropaludisme est complexe et encore mal connue. Elle est caractérisée par une séquestration des globules rouges infectés dans les micro-vaisseaux cérébraux activant les cellules endothéliales formant la barrière hémato-encéphalique. Un cycle inflammatoire se met donc en place avec la production de cytokines et chimiokines et la migration des cellules immunitaires telles que les monocytes et lymphocytes jusqu'au cerveau. Finalement, l'ensemble de ces phénomènes aboutit à une obstruction du flux sanguin et une altération de la barrière hémato-encéphalique conduisant aux dommages neurologiques et au coma des patients. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes permettrait d'améliorer la prise en charge des patients et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Au cours de cette thèse, je me suis intéressée à l'identification des facteurs immunitaires impliqués dans la neuroinflammation et sa résolution au cours d'un paludisme cérébral. Mes travaux étaient centrés sur les monocytes/macrophages, cellules clés du système immunitaire capables de moduler les balances pro/anti-inflammatoires et pro/antioxydantes essentielles à la résolution palustre. Le rôle des 3 sous-populations monocytaires au cours du neuropaludisme reste encore peu étudié et à éclaircir. Afin de mieux comprendre leur implication dans la pathologie palustre, une approche combinant un modèle murin expérimental de paludisme cérébral et deux études chez des enfants béninois atteints de différentes formes cliniques de paludisme a été mise en place.

La première étude a été réalisée sur une cohorte d'enfants béninois atteints de différentes formes cliniques de paludisme : paludisme non compliqué (UM), anémie sévère palustre (SMA) et neuropaludisme (CM). Cette étude a permis de mettre en évidence des facteurs de risque et de protection du neuropaludisme. Dans un second temps, une étude a été menée sur un modèle murin expérimental de paludisme cérébral, basé sur des souris C57BL/6 infectées par *P. berghei ANKA* et traitées ou non tardivement à la CQ. Ce modèle permettait de se rapprocher des conditions réelles de l'infection et d'étudier la cinétique des mécanismes mis en place au cours de l'infection et de la résolution de la neuroinflammation (J12) dans le sang, la rate et le cerveau des souris. Enfin, dans le cadre du projet NEUROCM, une seconde étude chez le patient a été menée avec la mise en place d'une nouvelle cohorte incluant un plus grand nombre d'enfants atteints de paludisme non-compliqué (UM) et de neuropaludisme (CM). Un suivi des patients à J3 et J21 post-inclusion a également été effectué, permettant ainsi de compléter les résultats déjà obtenus.

Les résultats des trois études ont mis en lumière l'implication des monocytes non-classiques de la circulation périphérique dans la protection vis-à-vis des formes sévères de paludisme (CM, SMA). Notre modèle murin d'ECM a permis de mettre en évidence le rôle protecteur de cette sous-population à la fois dans le sang, la rate et le cerveau des souris dans la phase aiguë de la neuroinflammation (J7). Le rôle des monocytes classiques et intermédiaires dans la pathologie palustre reste encore à éclaircir. Lors de nos deux études sur le patient, le pourcentage de monocytes classiques ne discriminait pas une forme clinique des autres (UM, CM, SMA) et n'évoluait pas à J3 et J21, mais était associé au décès des patients lors de la première étude. Chez la souris, une augmentation du pourcentage de cette population a été observée dans la rate lors de l'apparition des symptômes neurologiques (J5), suggérant son rôle dans la pathogénicité palustre, mais son augmentation dans le cerveau des souris au cours de la résolution palustre (J8) suggère en revanche un rôle plus protecteur. Concernant les monocytes intermédiaires, aucune différence n'avait été observée lors de notre première étude chez l'enfant béninois entre les différentes formes cliniques et devenir du patient (Survie/Décès), contrairement aux résultats de la cohorte NEUROCM où un fort pourcentage de monocytes intermédiaires était corrélé à la survie des patients CM. Dans le cerveau des souris, à l'inverse, cette population présentait un rôle délétère à J7 mais évoluait vers un rôle plus favorable à J12, tout comme la microglie, macrophages résidents du cerveau.
Concernant les phénotypes de ces populations, une faible expression de CD14, récepteur au LPS des bactéries et corécepteur du TLR4, de CD16, récepteur impliqué dans la phagocytose

opsonique des GRi, ainsi que de HLA-DR, récepteur impliqué dans la présentation des peptides antigéniques aux LT CD4, était associée à la gravité palustre et au décès des patients CM suggérant leur rôle protecteur dans la pathologie palustre. Pour CMH-II, l'équivalent de HLA-DR chez la souris, une inhibition de son expression sur les monocytes intermédiaires et la microglie, dans le cerveau des souris à J7, était corrélée aux symptômes neurologiques traduisant, là encore, son rôle favorable. Par ailleurs, dans nos trois études, le récepteur CD36, impliqué dans la phagocytose non-opsonique des GRi, semble également jouer un rôle protecteur au cours du neuropaludisme. En effet, une plus faible expression de CD36 sur les monocytes classiques, population exprimant le plus ce récepteur chez l'homme, a été observée chez les patients CM comparé aux UM. Chez la souris, CD36 est principalement exprimé par les monocytes non-classiques ($Ly6C^{low}$), et son expression était également diminuée dans le sang périphérique des souris à J7. Les résultats du modèle murin ont également révélé un rôle potentiellement bénéfique de CD36 à la surface des autres populations monocytaires dans la rate et le cerveau des souris dès l'apparition des symptômes neurologiques. Concernant CD163, impliqué dans l'internalisation du complexe Hb/Haptoglobine, une faible expression génique de ce marqueur par les monocytes classiques et intermédiaires a été associée au décès des patients CM. Chez la souris, son expression à la surface des monocytes non-classiques ($Ly6C^{low}$) était également corrélée à la résolution palustre. En revanche, CD163 semble jouer un rôle défavorable dans la rate et le cerveau des souris à J5 et J7 lorsqu'il est exprimé par les monocytes intermédiaires ($Ly6C^{int}$) et la microglie. Plus globalement, de fortes expressions protéiques et géniques de CCR2 et CX3CR1, deux récepteurs aux chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites inflammatoires, ont été associées à la gravité palustre et au décès des patients CM. Enfin, chez la souris, une inhibition de l'expression génique de *Nrf2* et *HMOX1*, deux gènes impliqués dans les réponses antioxydantes, par les monocytes non-classiques a été observée, contrairement aux résultats obtenus ches les patients indiquant une plus forte expression de ces gènes par cette même population.

Lors de l'étude NEUROCM, une capacité réduite des monocytes à induire la production de ROS a été corrélée à la gravité palustre et au décès des patients soulignant le rôle essentiel des réponses pro-oxydantes des monocytes dans l'élimination des GRi et la lutte contre l'infection palustre.

Pour finir, une étude plus globale des médiateurs pro/anti-inflammatoires et oxydants mis en jeu lors d'un neuropaludisme a été effectuée. Une diminution des concentrations des chimiokines CCL22 et CXCL5, respectivement impliquées dans la migration des LT

régulateurs et des neutrophiles vers les sites inflammatoires, a été observée à la fois chez la souris (sang, cerveau) et chez les patients atteints de neuropaludisme (plasma). De plus, une augmentation des concentrations plasmatiques des principales cytokines et chimiokines impliquées dans le recrutement des monocytes et lymphocytes vers les sites inflammatoires, a été observée dans le sang périphérique, à la fois chez la souris et le patient, et a été associée à la gravité palustre et au décès des patients CM. Dans le cerveau des souris, si la tendance va également vers une augmentation des concentrations des chimiokines précédemment étudiées, nous avons en revanche observé une diminution des concentrations de cytokines. Ce résultat surprenant nous force à nous questionner sur la représentativité des phénomènes observés dans les différents compartiments de l'organisme (sang périphérique, rate, cerveau) et met en doute la pertinence de l'extrapolation des résultats murins cérébraux à l'homme et la nécessité de mettre en place des études cliniques chez les patients. Néanmoins, de nombreux marqueurs sanguins périphériques ont été observés comme évoluant de façon similaire entre nos études chez le patient et notre modèle murin, renforçant la pertinence de nos résultats.

L'ensemble de ces résultats apporte un nouvel éclairage sur l'implication des monocytes/macrophages au cours du neuropaludisme et leur rôle dans la régulation des réponses pro/anti-inflammatoires et oxydantes. Une meilleure compréhension de la cinétique des réponses immunologiques mises en place nous permettra d'élaborer de nouvelles stratégies de prise en charge et de traitement adaptées au patient. L'objectif du projet NEUROCM est d'étudier les relations entre les facteurs de l'hôte et du parasite au cours du neuropaludisme. Un nouveau travail consistera à corréler nos données immunologiques avec les résultats du WP2 centré sur les facteurs parasitaires mis en jeu lors de l'infection. Cela devrait aboutir à une analyse commune des données obtenues sur les parasites et sur les monocytes des patients et permettre d'éclairer les connaissances des interactions hôte/parasites dans le contexte du neuropaludisme de l'enfant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **WHO**. World malaria report 2019 [Online]. https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241565721.

2. **Kumar R**, **Loughland JR**, **Ng SS**, **Boyle MJ**, **Engwerda CR**. The regulation of CD4+ T cells during malaria. *Immunol Rev* 293: 70–87, 2020.

3. **Stevenson MM**, **Riley EM**. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews Immunology* 4: 169–180, 2004.

4. **Pereira DMS**, **Carvalho Júnior AR**, **Lacerda EM da CB**, **da Silva LCN**, **Marinho CRF**, **André E**, **Fernandes ES**. Oxidative and nitrosative stresses in cerebral malaria: can we target them to avoid a bad prognosis? *J Antimicrob Chemother* 75: 1363–1373, 2020.

5. **Marimuthu R**, **Francis H**, **Dervish S**, **Li SCH**, **Medbury H**, **Williams H**. Characterization of Human Monocyte Subsets by Whole Blood Flow Cytometry Analysis. *J Vis Exp* , 2018.

6. **Santepubliquefrance**. *Recommandations sanitaires 2019 pour les voyageurs (à l'attention des professionnels de santé)*. 2019.

7. **Joste V**, **Maurice L**, **Bertin GI**, **Aubouy A**, **Boumédiène F**, **Houzé S**, **Ajzenberg D**, **Argy N**, **Massougbodji A**, **Dossou-Dagba I**, **Alao MJ**, **Cot M**, **Deloron P**, **Faucher J-F**, **NeuroCM group**. Identification of Plasmodium falciparum and host factors associated with cerebral malaria: description of the protocol for a prospective, case-control study in Benin (NeuroCM). *BMJ Open* 9: e027378, 2019.

8. **WHO**. *Stratégie Technique Mondiale De Lutte Contre Le Paludisme 2016-2030.* World Health Organization, 2015.

9. **WHO**. Paludisme - Principaux repères [Online]. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria.

10. **WHO**. Guidelines for the Treatment of Malaria [Online]. 3rd ed. World Health Organization. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294440/.

11. **WHO**. *World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges*. 2020.

12. **Poinar G**. What Fossils Reveal About the Protozoa Progenitors, Geographic Provinces, and Early Hosts of Malarial Organisms. *Am Entomol* 62: 22–25, 2016.

13. **Poinar G**. Plasmodium dominicana n. sp. (Plasmodiidae: Haemospororida) from Tertiary Dominican amber. *Syst Parasitol* 61: 47–52, 2005.

14. **Liu W**, **Li Y**, **Learn GH**, **Rudicell RS**, **Robertson JD**, **Keele BF**, **Ndjango J-BN**, **Sanz CM**, **Morgan DB**, **Locatelli S**, **Gonder MK**, **Kranzusch PJ**, **Walsh PD**, **Delaporte E**, **Mpoudi-Ngole E**, **Georgiev AV**, **Muller MN**, **Shaw GM**, **Peeters M**,

Sharp PM, **Rayner JC**, **Hahn BH**. Origin of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in gorillas. *Nature* 467: 420–425, 2010.

15. **Otto TD**, **Gilabert A**, **Crellen T**, **Böhme U**, **Arnathau C**, **Sanders M**, **Oyola SO**, **Okouga AP**, **Boundenga L**, **Willaume E**, **Ngoubangoye B**, **Moukodoum ND**, **Paupy C**, **Durand P**, **Rougeron V**, **Ollomo B**, **Renaud F**, **Newbold C**, **Berriman M**, **Prugnolle F**. Genomes of all known members of a Plasmodium subgenus reveal paths to virulent human malaria. *Nature Microbiology* 3: 687–697, 2018.

16. **Miller LH**, **Good MF**, **Milon G**. Malaria pathogenesis. *Science* 264: 1878–1883, 1994.

17. **Bruce-Chwatt LJ**. *History of malaria from prehistory to eradication.* McGregor SI. Churchill Livingstone, Edinburgh: In Wernsdorfer WH, 1988.

18. **Cunha CB**, **Cunha BA**. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J Vector Borne Dis* 45: 194–199, 2008.

19. **Laveran A**. *Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme: description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre*. J.-B. Baillière, 1881.

20. **Ross R**. On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood. *Br Med J* 2: 1786–1788, 1897.

21. **Trager W**, **Jensen JB**. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193: 673–675, 1976.

22. **WHO**. Il y a vingt ans, plus de 90 000 cas – aujourd'hui, aucun : la Région européenne est exempte de paludisme [Online]. http://www.euro.who.int/fr/media-centre/sections/press-releases/2016/04/from-over-90-000-cases-to-zero-in-two-decades-the-european-region-is-malaria-free.

23. **WHO**. *Factsheet - History of malaria elimination in the European Region*. [date unknown].

24. **Cowman AF**, **Crabb BS**. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124: 755–766, 2006.

25. **Grellier P**. La différenciation des mérozoïtes de plasmodium falciparum et la phase de réinvasion des globules rouges [Online]. Poitiers: 1990. http://www.theses.fr/1990POIT2256.

26. **Miller LH**, **Mason SJ**, **Clyde DF**, **McGinniss MH**. The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med* 295: 302–304, 1976.

27. **Rifakis PM**, **Hernandez O**, **Fernández CT**, **Rodriguez-Morales AJ**, **Von A**, **Franco-Paredes C**. Atypical Plasmodium vivax malaria in a traveler: bilateral hydronephrosis, severe thrombocytopenia, and hypotension. *J Travel Med* 15: 119–121, 2008.

28. **WHO**. *Prise en charge du paludisme grave (La). Guide pratique troisième édition (3rd ed.)*. [date unknown].

29. **Collins WE**, **Jeffery GM**. Plasmodium ovale: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev* 18: 570–581, 2005.

30. **Durante Mangoni E**, **Severini C**, **Menegon M**, **Romi R**, **Ruggiero G**, **Majori G**. Case report: An unusual late relapse of Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* 68: 159–160, 2003.

31. **Neri S**, **Pulvirenti D**, **Patamia I**, **Zoccolo A**, **Castellino P**. Acute renal failure in Plasmodium malariae infection. *Neth J Med* 66: 166–168, 2008.

32. **Collins WE**, **Jeffery GM**. Plasmodium malariae: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev* 20: 579–592, 2007.

33. **Khim N**, **Siv S**, **Kim S**, **Mueller T**, **Fleischmann E**, **Singh B**, **Divis PCS**, **Steenkeste N**, **Duval L**, **Bouchier C**, **Duong S**, **Ariey F**, **Ménard D**. Plasmodium knowlesi Infection in Humans, Cambodia, 2007–2010. *Emerg Infect Dis* 17: 1900–1902, 2011.

34. **Singh B**, **Kim Sung L**, **Matusop A**, **Radhakrishnan A**, **Shamsul SSG**, **Cox-Singh J**, **Thomas A**, **Conway DJ**. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet* 363: 1017–1024, 2004.

35. **Singh B**, **Daneshvar C**. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. *Clin Microbiol Rev* 26: 165–184, 2013.

36. **CDC-Centers for Disease Control and Prevention**. CDC - Malaria - About Malaria - Biology [Online]. https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html.

37. **Miller LH**, **Baruch DI**, **Marsh K**, **Doumbo OK**. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415: 673–679, 2002.

38. **Vaughan AM**, **Aly ASI**, **Kappe SHI**. Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: Gliding and Hiding. *Cell Host Microbe* 4: 209–218, 2008.

39. **White NJ**, **Pukrittayakamee S**, **Hien TT**, **Faiz MA**, **Mokuolu OA**, **Dondorp AM**. Malaria. *The Lancet* 383: 723–735, 2014.

40. **Claessens A**, **Adams Y**, **Ghumra A**, **Lindergard G**, **Buchan CC**, **Andisi C**, **Bull PC**, **Mok S**, **Gupta AP**, **Wang CW**, **Turner L**, **Arman M**, **Raza A**, **Bozdech Z**, **Rowe JA**. A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E1772–E1781, 2012.

41. **Kraemer SM**, **Smith JD**. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Current Opinion in Microbiology* 9: 374–380, 2006.

42. **Vogel G**. The Forgotten Malaria. *Science* 342: 684, 2013.

43. **Gonçalves BP**, **Fried M**, **Duffy PE**. Parasite burden and severity of malaria in Tanzanian children. *N Engl J Med* 371: 482, 2014.

44. **Trape JF**, **Rogier C**. Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol Today (Regul Ed)* 12: 236–240, 1996.

45. **Sazama K**. Prevention of transfusion-transmitted malaria: is it time to revisit the standards? *Transfusion* 31: 786–788, 1991.

46. **Bartoloni A**, **Zammarchi L**. Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 4, 2012.

47. **Oluwayemi IO**, **Brown BJ**, **Oyedeji OA**, **Oluwayemi MA**. Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria. *Pan Afr Med J* 15: 88, 2013.

48. **Bardají A**, **Sigauque B**, **Sanz S**, **Maixenchs M**, **Ordi J**, **Aponte JJ**, **Mabunda S**, **Alonso PL**, **Menéndez C**. Impact of Malaria at the End of Pregnancy on Infant Mortality and Morbidity. *J Infect Dis* 203: 691–699, 2011.

49. **Beeson JG**, **Amin N**, **Kanjala M**, **Rogerson SJ**. Selective Accumulation of Mature Asexual Stages of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes in the Placenta. *Infect Immun* 70: 5412–5415, 2002.

50. **Egan TJ**, **Ross DC**, **Adams PA**. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment). *FEBS Lett* 352: 54–57, 1994.

51. **Pandey AV**, **Bisht H**, **Babbarwal VK**, **Srivastava J**, **Pandey KC**, **Chauhan VS**. Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine. *Biochem J* 355: 333–338, 2001.

52. **Maxwell CA**, **Msuya E**, **Sudi M**, **Njunwa KJ**, **Carneiro IA**, **Curtis CF**. Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania. *Trop Med Int Health* 7: 1003–1008, 2002.

53. **Mesvaccins.net**. Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès - Mosquirix [Online]. *Mon carnet de vaccination électronique, pour être mieux vacciné, sans défaut ni excès*: [date unknown]. http://www.mesvaccins.net/web/vaccines/528-mosquirix.

54. **European Medicines Agency**. *First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA*. [date unknown].

55. **WHO**. Malaria Vaccines: WHO Position Paper - January 2016 [Online]. https://www.who.int/publications-detail-redirect/who-position-paper-on-malaria-vaccines.

56. **WHO**. Questions et réponses sur le programme de mise en œuvre de la vaccination antipaludique (MVIP) [Online]. World Health Organization. http://www.who.int/malaria/media/malaria-vaccine-implementation-qa/fr/.

57. **WHO**. *Lignes directrices pour la lutte contre les vecteurs du paludisme*. [date unknown].

58. **White NJ**. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resist Updat* 1: 3–9, 1998.

59. **Fidock DA**, **Nomura T**, **Talley AK**, **Cooper RA**, **Dzekunov SM**, **Ferdig MT**, **Ursos LM**, **Sidhu AB**, **Naudé B**, **Deitsch KW**, **Su XZ**, **Wootton JC**, **Roepe PD**, **Wellems**

TE. Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 6: 861–871, 2000.

60. **Nsanzabana C**. Resistance to Artemisinin Combination Therapies (ACTs): Do Not Forget the Partner Drug! *Trop Med Infect Dis* 4, 2019.

61. **Triglia T**, **Cowman AF**. The mechanism of resistance to sulfa drugs in Plasmodium falciparum. *Drug Resist Updat* 2: 15–19, 1999.

62. **Flegg JA**, **Guerin PJ**, **White NJ**, **Stepniewska K**. Standardizing the measurement of parasite clearance in falciparum malaria: the parasite clearance estimator. *Malar J* 10: 339, 2011.

63. **Jambou R**, **Legrand E**, **Niang M**, **Khim N**, **Lim P**, **Volney B**, **Ekala MT**, **Bouchier C**, **Esterre P**, **Fandeur T**, **Mercereau-Puijalon O**. Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 366: 1960–1963, 2005.

64. **WHO**. Status report on artemisinin resistance and ACT efficacy [Online]. https://www.who.int/publications-detail-redirect/status-report-on-artemisinin-resistance-and-act-efficacy.

65. **Aidoo M**, **Terlouw DJ**, **Kolczak MS**, **McElroy PD**, **ter Kuile FO**, **Kariuki S**, **Nahlen BL**, **Lal AA**, **Udhayakumar V**. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* 359: 1311–1312, 2002.

66. **Chippaux JP**, **Massougbodji A**, **Boulard JC**, **Akogbeto M**. Morbidity and severity of malaria attacks in carriers of sickle-cell trait. *Rev Epidemiol Sante Publique* 40: 240–245, 1992.

67. **Fleming AF**, **Storey J**, **Molineaux L**, **Iroko EA**, **Attai ED**. Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. I. Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait, malaria and survival. *Ann Trop Med Parasitol* 73: 161–172, 1979.

68. **Cabrera G**, **Cot M**, **Migot-Nabias F**, **Kremsner PG**, **Deloron P**, **Luty AJF**. The sickle cell trait is associated with enhanced immunoglobulin G antibody responses to Plasmodium falciparum variant surface antigens. *J Infect Dis* 191: 1631–1638, 2005.

69. **Ferreira A**, **Marguti I**, **Bechmann I**, **Jeney V**, **Chora A**, **Palha NR**, **Rebelo S**, **Henri A**, **Beuzard Y**, **Soares MP**. Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell* 145: 398–409, 2011.

70. **Pasvol G**. Does α +-Thalassaemia Protect against Malaria? *PLoS Med* 3, 2006.

71. **Wambua S**, **Mwangi TW**, **Kortok M**, **Uyoga SM**, **Macharia AW**, **Mwacharo JK**, **Weatherall DJ**, **Snow RW**, **Marsh K**, **Williams TN**. The Effect of α +-Thalassaemia on the Incidence of Malaria and Other Diseases in Children Living on the Coast of Kenya. *PLoS Med* 3, 2006.

72. **Luzzi GA**, **Merry AH**, **Newbold CI**, **Marsh K**, **Pasvol G**. Protection by alpha-thalassaemia against Plasmodium falciparum malaria: modified surface antigen

expression rather than impaired growth or cytoadherence. *Immunol Lett* 30: 233–240, 1991.

73. **Ayi K**, **Turrini F**, **Piga A**, **Arese P**. Enhanced phagocytosis of ring-parasitized mutant erythrocytes: a common mechanism that may explain protection against falciparum malaria in sickle trait and beta-thalassemia trait. *Blood* 104: 3364–3371, 2004.

74. **Luzzatto L**, **Usanga FA**, **Reddy S**. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science* 164: 839–842, 1969.

75. **Ruwende C**, **Khoo SC**, **Snow RW**, **Yates SN**, **Kwiatkowski D**, **Gupta S**, **Warn P**, **Allsopp CE**, **Gilbert SC**, **Peschu N**. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* 376: 246–249, 1995.

76. **Miller LH**. Hypothesis on the mechanism of erythrocyte invasion by malaria merozoites. *Bull World Health Organ* 55: 157–162, 1977.

77. **Michon P**, **Woolley I**, **Wood EM**, **Kastens W**, **Zimmerman PA**, **Adams JH**. Duffy-null promoter heterozygosity reduces DARC expression and abrogates adhesion of the P. vivax ligand required for blood-stage infection. *FEBS Lett* 495: 111–114, 2001.

78. **Deepa null**, **Alwar VA**, **Rameshkumar K**, **Ross C**. ABO blood groups and malaria related clinical outcome. *J Vector Borne Dis* 48: 7–11, 2011.

79. **Migot-Nabias F**, **Mombo LE**, **Luty AJ**, **Dubois B**, **Nabias R**, **Bisseye C**, **Millet P**, **Lu CY**, **Deloron P**. Human genetic factors related to susceptibility to mild malaria in Gabon. *Genes Immun* 1: 435–441, 2000.

80. **Gazzinelli RT**, **Kalantari P**, **Fitzgerald KA**, **Golenbock DT**. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol* 14: 744–757, 2014.

81. **Gowda DC**, **Wu X**. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front Immunol* 9: 3006, 2018.

82. **Dobbs KR**, **Crabtree JN**, **Dent AE**. Innate immunity to malaria-The role of monocytes. *Immunol Rev* 293: 8–24, 2020.

83. **Tannous S**, **Ghanem E**. A bite to fight: front-line innate immune defenses against malaria parasites. *Pathog Glob Health* 112: 1–12, 2018.

84. **Parmar R**, **Patel H**, **Yadav N**, **Parikh R**, **Patel K**, **Mohankrishnan A**, **Bhurani V**, **Joshi U**, **Dalai SK**. Infectious Sporozoites of Plasmodium berghei Effectively Activate Liver CD8α+ Dendritic Cells. *Front Immunol* 9: 192, 2018.

85. **Biron CA**, **Nguyen KB**, **Pien GC**, **Cousens LP**, **Salazar-Mather TP**. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 17: 189–220, 1999.

86. **Merad M**, **Sathe P**, **Helft J**, **Miller J**, **Mortha A**. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31: 563–604, 2013.

87. **Bettiol E**, **Carapau D**, **Galan-Rodriguez C**, **Ocaña-Morgner C**, **Rodriguez A**. Dual effect of Plasmodium-infected erythrocytes on dendritic cell maturation. *Malar J* 9: 64, 2010.

88. **Urban BC**, **Todryk S**. Malaria pigment paralyzes dendritic cells. *J Biol* 5: 4, 2006.

89. **Demeure CE**, **Brahimi K**, **Hacini F**, **Marchand F**, **Péronet R**, **Huerre M**, **St-Mezard P**, **Nicolas J-F**, **Brey P**, **Delespesse G**, **Mécheri S**. Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. *J Immunol* 174: 3932–3940, 2005.

90. **Yamauchi LM**, **Coppi A**, **Snounou G**, **Sinnis P**. Plasmodium sporozoites trickle out of the injection site. *Cell Microbiol* 9: 1215–1222, 2007.

91. **Kapelski S**, **Klockenbring T**, **Fischer R**, **Barth S**, **Fendel R**. Assessment of the neutrophilic antibody-dependent respiratory burst (ADRB) response to Plasmodium falciparum. *J Leukoc Biol* 96: 1131–1142, 2014.

92. **Caligiuri MA**. Human natural killer cells. *Blood* 112: 461–469, 2008.

93. **Artavanis-Tsakonas K**, **Riley EM**. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Immunol* 169: 2956–2963, 2002.

94. **De Souza JB**, **Williamson KH**, **Otani T**, **Playfair JH**. Early gamma interferon responses in lethal and nonlethal murine blood-stage malaria. *Infect Immun* 65: 1593–1598, 1997.

95. **Hermsen CC**, **Konijnenberg Y**, **Mulder L**, **Loé C**, **van Deuren M**, **van der Meer JWM**, **van Mierlo GJ**, **Eling WMC**, **Hack CE**, **Sauerwein RW**. Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental Plasmodium falciparum infections. *Clin Exp Immunol* 132: 467–472, 2003.

96. **Nielsen CM**, **Wolf A-S**, **Goodier MR**, **Riley EM**. Synergy between Common γ Chain Family Cytokines and IL-18 Potentiates Innate and Adaptive Pathways of NK Cell Activation. *Front Immunol* 7: 101, 2016.

97. **Roland J**, **Soulard V**, **Sellier C**, **Drapier A-M**, **Di Santo JP**, **Cazenave P-A**, **Pied S**. NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development. *J Immunol* 177: 1229–1239, 2006.

98. **Luty AJ**, **Lell B**, **Schmidt-Ott R**, **Lehman LG**, **Luckner D**, **Greve B**, **Matousek P**, **Herbich K**, **Schmid D**, **Migot-Nabias F**, **Deloron P**, **Nussenzweig RS**, **Kremsner PG**. Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with Plasmodium falciparum in young African children. *J Infect Dis* 179: 980–988, 1999.

99. **Newman KC**, **Korbel DS**, **Hafalla JC**, **Riley EM**. Cross-talk with myeloid accessory cells regulates human natural killer cell interferon-gamma responses to malaria. *PLoS Pathog* 2: e118, 2006.

100. **Ing R**, **Stevenson MM**. Dendritic cell and NK cell reciprocal cross talk promotes gamma interferon-dependent immunity to blood-stage Plasmodium chabaudi AS infection in mice. *Infect Immun* 77: 770–782, 2009.

101. **Mavoungou E**, **Luty AJF**, **Kremsner PG**. Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells in vitro. *Eur Cytokine Netw* 14: 134–142, 2003.

102. **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* 86: 22–29, 1991.

103. **Arora G**, **Hart GT**, **Manzella-Lapeira J**, **Doritchamou JY**, **Narum DL**, **Thomas LM**, **Brzostowski J**, **Rajagopalan S**, **Doumbo OK**, **Traore B**, **Miller LH**, **Pierce SK**, **Duffy PE**, **Crompton PD**, **Desai SA**, **Long EO**. NK cells inhibit Plasmodium falciparum growth in red blood cells via antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Elife* 7, 2018.

104. **Hart GT**, **Tran TM**, **Theorell J**, **Schlums H**, **Arora G**, **Rajagopalan S**, **Sangala ADJ**, **Welsh KJ**, **Traore B**, **Pierce SK**, **Crompton PD**, **Bryceson YT**, **Long EO**. Adaptive NK cells in people exposed to Plasmodium falciparum correlate with protection from malaria. *J Exp Med* 216: 1280–1290, 2019.

105. **Romero JF**, **Eberl G**, **MacDonald HR**, **Corradin G**. CD1d-restricted NK T cells are dispensable for specific antibody responses and protective immunity against liver stage malaria infection in mice. *Parasite Immunol* 23: 267–269, 2001.

106. **Hansen DS**, **Siomos M-A**, **De Koning-Ward T**, **Buckingham L**, **Crabb BS**, **Schofield L**. CD1d-restricted NKT cells contribute to malarial splenomegaly and enhance parasite-specific antibody responses. *Eur J Immunol* 33: 2588–2598, 2003.

107. **Ho M**, **Tongtawe P**, **Kriangkum J**, **Wimonwattrawatee T**, **Pattanapanyasat K**, **Bryant L**, **Shafiq J**, **Suntharsamai P**, **Looareesuwan S**, **Webster HK**. Polyclonal expansion of peripheral gamma delta T cells in human Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* 62: 855–862, 1994.

108. **Yañez DM**, **Manning DD**, **Cooley AJ**, **Weidanz WP**, **van der Heyde HC**. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. *J Immunol* 157: 1620–1624, 1996.

109. **Ho M**, **Webster HK**, **Tongtawe P**, **Pattanapanyasat K**, **Weidanz WP**. Increased gamma delta T cells in acute Plasmodium falciparum malaria. *Immunol Lett* 25: 139–141, 1990.

110. **Hviid L**, **Kurtzhals JAL**, **Adabayeri V**, **Loizon S**, **Kemp K**, **Goka BQ**, **Lim A**, **Mercereau-Puijalon O**, **Akanmori BD**, **Behr C**. Perturbation and Proinflammatory Type Activation of Vδ1+ γδ T Cells in African Children with Plasmodium falciparum Malaria. *Infect Immun* 69: 3190–3196, 2001.

111. **Patel SS**, **Wacholtz MC**, **Duby AD**, **Thiele DL**, **Lipsky PE**. Analysis of the functional capabilities of CD3+CD4-CD8- and CD3+CD4+CD8+ human T cell clones. *The Journal of Immunology* 143: 1108–1117, 1989.

112. **D'Ombrain MC**, **Robinson LJ**, **Stanisic DI**, **Taraika J**, **Bernard N**, **Michon P**, **Mueller I**, **Schofield L**. Association of early interferon-gamma production with immunity to clinical malaria: a longitudinal study among Papua New Guinean children. *Clin Infect Dis* 47: 1380–1387, 2008.

113. **Costa G**, **Loizon S**, **Guenot M**, **Mocan I**, **Halary F**, **de Saint-Basile G**, **Pitard V**, **Déchanet-Merville J**, **Moreau J-F**, **Troye-Blomberg M**, **Mercereau-Puijalon O**, **Behr C**. Control of Plasmodium falciparum erythrocytic cycle: γδ T cells target the red blood cell-invasive merozoites. *Blood* 118: 6952–6962, 2011.

114. **Hernández-Castañeda MA**, **Happ K**, **Cattalani F**, **Wallimann A**, **Blanchard M**, **Fellay I**, **Scolari B**, **Lannes N**, **Mbagwu S**, **Fellay B**, **Filgueira L**, **Mantel P-Y**, **Walch M**. γδ T Cells Kill Plasmodium falciparum in a Granzyme- and Granulysin-Dependent Mechanism during the Late Blood Stage. *J Immunol* 204: 1798–1809, 2020.

115. **Howard J**, **Loizon S**, **Tyler CJ**, **Duluc D**, **Moser B**, **Mechain M**, **Duvignaud A**, **Malvy D**, **Troye-Blomberg M**, **Moreau J-F**, **Eberl M**, **Mercereau-Puijalon O**, **Déchanet-Merville J**, **Behr C**, **Mamani-Matsuda M**. The Antigen-Presenting Potential of Vγ9Vδ2 T Cells During Plasmodium falciparum Blood-Stage Infection. *J Infect Dis* 215: 1569–1579, 2017.

116. **Silver KL**, **Higgins SJ**, **McDonald CR**, **Kain KC**. Complement driven innate immune response to malaria: fuelling severe malarial diseases. *Cell Microbiol* 12: 1036–1045, 2010.

117. **Mahanta A**, **Kar SK**, **Kakati S**, **Baruah S**. Heightened inflammation in severe malaria is associated with decreased IL-10 expression levels and neutrophils. *Innate Immun* 21: 546–552, 2015.

118. **Ioannidis LJ**, **Nie CQ**, **Ly A**, **Ryg-Cornejo V**, **Chiu CY**, **Hansen DS**. Monocyte- and Neutrophil-Derived CXCL10 Impairs Efficient Control of Blood-Stage Malaria Infection and Promotes Severe Disease. *J Immunol* 196: 1227–1238, 2016.

119. **Jagannathan P**, **Kim CC**, **Greenhouse B**, **Nankya F**, **Bowen K**, **Eccles-James I**, **Muhindo MK**, **Arinaitwe E**, **Tappero JW**, **Kamya MR**, **Dorsey G**, **Feeney ME**. Loss and dysfunction of $V\delta2^+$ γδ T cells are associated with clinical tolerance to malaria. *Sci Transl Med* 6: 251ra117, 2014.

120. **Stanisic DI**, **Cutts J**, **Eriksson E**, **Fowkes FJI**, **Rosanas-Urgell A**, **Siba P**, **Laman M**, **Davis TME**, **Manning L**, **Mueller I**, **Schofield L**. γδ T cells and CD14+ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria. *J Infect Dis* 210: 295–305, 2014.

121. **Yañez DM**, **Batchelder J**, **van der Heyde HC**, **Manning DD**, **Weidanz WP**. Gamma delta T-cell function in pathogenesis of cerebral malaria in mice infected with Plasmodium berghei ANKA. *Infect Immun* 67: 446–448, 1999.

122. **Nallandhighal S**, **Park GS**, **Ho Y-Y**, **Opoka RO**, **John CC**, **Tran TM**. Whole-Blood Transcriptional Signatures Composed of Erythropoietic and NRF2-Regulated Genes Differ Between Cerebral Malaria and Severe Malarial Anemia. *J Infect Dis* 219: 154–164, 2019.

123. **Piva L**, **Tetlak P**, **Claser C**, **Karjalainen K**, **Renia L**, **Ruedl C**. Cutting edge: Clec9A+ dendritic cells mediate the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 189: 1128–1132, 2012.

124. **Howland SW**, **Claser C**, **Poh CM**, **Gun SY**, **Rénia L**. Pathogenic CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *Semin Immunopathol* 37: 221–231, 2015.

125. **Howland SW**, **Poh CM**, **Rénia L**. Activated Brain Endothelial Cells Cross-Present Malaria Antigen. *PLoS Pathog* 11: e1004963, 2015.

126. **Haque A**, **Best SE**, **Unosson K**, **Amante FH**, **de Labastida F**, **Anstey NM**, **Karupiah G**, **Smyth MJ**, **Heath WR**, **Engwerda CR**. Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol* 186: 6148–6156, 2011.

127. **Villegas-Mendez A**, **Greig R**, **Shaw TN**, **de Souza JB**, **Findlay EG**, **Stumhofer JS**, **Hafalla JCR**, **Blount DG**, **Hunter CA**, **Riley EM**, **Couper KN**. IFN-γ producing CD4+ T cells promote experimental cerebral malaria by modulating CD8+ T cell accumulation within the brain. *J Immunol* 189: 968–979, 2012.

128. **DuPage M**, **Bluestone JA**. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol* 16: 149–163, 2016.

129. **Mooney JP**, **Wassmer SC**, **Hafalla JC**. Type I Interferon in Malaria: A Balancing Act. *Trends Parasitol* 33: 257–260, 2017.

130. **Reece WHH**, **Pinder M**, **Gothard PK**, **Milligan P**, **Bojang K**, **Doherty T**, **Plebanski M**, **Akinwunmi P**, **Everaere S**, **Watkins KR**, **Voss G**, **Tornieporth N**, **Alloueche A**, **Greenwood BM**, **Kester KE**, **McAdam KPWJ**, **Cohen J**, **Hill AVS**. A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural Plasmodium falciparum infection and disease. *Nat Med* 10: 406–410, 2004.

131. **Freitas do Rosário AP**, **Lamb T**, **Spence P**, **Stephens R**, **Lang A**, **Roers A**, **Muller W**, **O'Garra A**, **Langhorne J**. IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection. *J Immunol* 188: 1178–1190, 2012.

132. **Jankovic D**, **Kugler DG**, **Sher A**. IL-10 production by CD4 + effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunology* 3: 239–246, 2010.

133. **Boyle MJ**, **Jagannathan P**, **Bowen K**, **McIntyre TI**, **Vance HM**, **Farrington LA**, **Schwartz A**, **Nankya F**, **Naluwu K**, **Wamala S**, **Sikyomu E**, **Rek J**, **Greenhouse B**, **Arinaitwe E**, **Dorsey G**, **Kamya MR**, **Feeney ME**. The Development of Plasmodium falciparum-Specific IL10 CD4 T Cells and Protection from Malaria in Children in an Area of High Malaria Transmission. *Front Immunol* 8, 2017.

134. **Crotty S**. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* 50: 1132–1148, 2019.

135. **Beeson JG**, **Kurtovic L**, **Dobaño C**, **Opi DH**, **Chan J-A**, **Feng G**, **Good MF**, **Reiling L**, **Boyle MJ**. Challenges and strategies for developing efficacious and long-lasting malaria vaccines. *Sci Transl Med* 11, 2019.

136. **Nurieva RI**, **Chung Y**, **Martinez GJ**, **Yang XO**, **Tanaka S**, **Matskevitch TD**, **Wang Y-H**, **Dong C**. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325: 1001–1005, 2009.

137. **Morita R**, **Schmitt N**, **Bentebibel S-E**, **Ranganathan R**, **Bourdery L**, **Zurawski G**, **Foucat E**, **Dullaers M**, **Oh S**, **Sabzghabaei N**, **Lavecchio EM**, **Punaro M**, **Pascual V**, **Banchereau J**, **Ueno H**. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34: 108–121, 2011.

138. **Mitchell AJ**, **Hansen AM**, **Hee L**, **Ball HJ**, **Potter SM**, **Walker JC**, **Hunt NH**. Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria. *Infect Immun* 73: 5645–5653, 2005.

139. **Meding SJ**, **Cheng SC**, **Simon-Haarhaus B**, **Langhorne J**. Role of gamma interferon during infection with Plasmodium chabaudi chabaudi. *Infect Immun* 58: 3671–3678, 1990.

140. **D'Ombrain MC**, **Robinson LJ**, **Mueller I**, **Schofield L**. Mechanisms underlying early interferon-gamma production in human Plasmodium falciparum malaria. *Clin Infect Dis* 48: 1482–1483, 2009.

141. **Jagannathan P**, **Nankya F**, **Stoyanov C**, **Eccles-James I**, **Sikyomu E**, **Naluwu K**, **Wamala S**, **Nalubega M**, **Briggs J**, **Bowen K**, **Bigira V**, **Kapisi J**, **Kamya MR**, **Dorsey G**, **Feeney ME**. IFNγ Responses to Pre-erythrocytic and Blood-stage Malaria Antigens Exhibit Differential Associations With Past Exposure and Subsequent Protection. *J Infect Dis* 211: 1987–1996, 2015.

142. **Robinson LJ**, **D'Ombrain MC**, **Stanisic DI**, **Taraika J**, **Bernard N**, **Richards JS**, **Beeson JG**, **Tavul L**, **Michon P**, **Mueller I**, **Schofield L**. Cellular tumor necrosis factor, gamma interferon, and interleukin-6 responses as correlates of immunity and risk of clinical Plasmodium falciparum malaria in children from Papua New Guinea. *Infect Immun* 77: 3033–3043, 2009.

143. **Crutcher JM**, **Stevenson MM**, **Sedegah M**, **Hoffman SL**. Interleukin-12 and malaria. *Research in Immunology* 146: 552–559, 1995.

144. **Luty AJ**, **Perkins DJ**, **Lell B**, **Schmidt-Ott R**, **Lehman LG**, **Luckner D**, **Greve B**, **Matousek P**, **Herbich K**, **Schmid D**, **Weinberg JB**, **Kremsner PG**. Low interleukin-12 activity in severe Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* 68: 3909–3915, 2000.

145. **Chaisavaneeyakorn S**, **Othoro C**, **Shi YP**, **Otieno J**, **Chaiyaroj SC**, **Lal AA**, **Udhayakumar V**. Relationship between plasma Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 levels and severe malarial anemia in an area of holoendemicity in western Kenya. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 362–366, 2003.

146. **Malaguarnera L**, **Imbesi RM**, **Pignatelli S**, **Simporè J**, **Malaguarnera M**, **Musumeci S**. Increased levels of interleukin-12 in Plasmodium falciparum malaria: correlation with the severity of disease. *Parasite Immunol* 24: 387–389, 2002.

147. **Schmidt KE**, **Schumak B**, **Specht S**, **Dubben B**, **Limmer A**, **Hoerauf A**. Induction of pro-inflammatory mediators in Plasmodium berghei infected BALB/c mice breaks blood-brain-barrier and leads to cerebral malaria in an IL-12 dependent manner. *Microbes Infect* 13: 828–836, 2011.

148. **Shryock N**, **McBerry C**, **Salazar Gonzalez RM**, **Janes S**, **Costa FTM**, **Aliberti J**. Lipoxin A_4 and 15-epi-lipoxin A_4 protect against experimental cerebral malaria by inhibiting IL-12/IFN-γ in the brain. *PLoS One* 8: e61882, 2013.

149. **Amani V**, **Vigário AM**, **Belnoue E**, **Marussig M**, **Fonseca L**, **Mazier D**, **Rénia L**. Involvement of IFN-gamma receptor-medicated signaling in pathology and anti-malarial immunity induced by Plasmodium berghei infection. *Eur J Immunol* 30: 1646–1655, 2000.

150. **Lou J**, **Lucas R**, **Grau GE**. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev* 14: 810–820, table of contents, 2001.

151. **Villegas-Mendez A**, **Strangward P**, **Shaw TN**, **Rajkovic I**, **Tosevski V**, **Forman R**, **Muller W**, **Couper KN**. Gamma Interferon Mediates Experimental Cerebral Malaria by Signaling within Both the Hematopoietic and Nonhematopoietic Compartments. *Infect Immun* 85, 2017.

152. **Dalko E**, **Tchitchek N**, **Pays L**, **Herbert F**, **Cazenave P-A**, **Ravindran B**, **Sharma S**, **Nataf S**, **Das B**, **Pied S**. Erythropoietin Levels Increase during Cerebral Malaria and Correlate with Heme, Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in India. *PLoS ONE* 11: e0158420, 2016.

153. **Grau GE**, **Taylor TE**, **Molyneux ME**, **Wirima JJ**, **Vassalli P**, **Hommel M**, **Lambert PH**. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* 320: 1586–1591, 1989.

154. **Kwiatkowski D**, **Hill AV**, **Sambou I**, **Twumasi P**, **Castracane J**, **Manogue KR**, **Cerami A**, **Brewster DR**, **Greenwood BM**. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Lancet* 336: 1201–1204, 1990.

155. **Shabani E**, **Ouma BJ**, **Idro R**, **Bangirana P**, **Opoka RO**, **Park GS**, **Conroy AL**, **John CC**. Elevated cerebrospinal fluid tumour necrosis factor is associated with acute and long-term neurocognitive impairment in cerebral malaria. *Parasite Immunol* 39, 2017.

156. **Medana IM**, **Hunt NH**, **Chaudhri G**. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* 150: 1473–1486, 1997.

157. **Li C**, **Sanni LA**, **Omer F**, **Riley E**, **Langhorne J**. 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. *Infect Immun* 71: 4850–4856, 2003.

158. **Sanni LA**, **Jarra W**, **Li C**, **Langhorne J**. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi. *Infect Immun* 72: 3054–3058, 2004.

159. **Kurtzhals JA**, **Adabayeri V**, **Goka BQ**, **Akanmori BD**, **Oliver-Commey JO**, **Nkrumah FK**, **Behr C**, **Hviid L**. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 351: 1768–1772, 1998.

160. **Omer FM**, **Riley EM**. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J Exp Med* 188: 39–48, 1998.

161. **Sarkar S**, **Keswani T**, **Sengupta A**, **Mitra S**, **Bhattacharyya A**. Differential modulation of glial cell mediated neuroinflammation in Plasmodium berghei ANKA infection by TGF β and IL 6. *Cytokine* 99: 249–259, 2017.

162. **Blanc A-L**, **Keswani T**, **Gorgette O**, **Bandeira A**, **Malissen B**, **Cazenave P-A**, **Pied S**. Suppression of CD4+ Effector Responses by Naturally Occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ Regulatory T Cells Contributes to Experimental Cerebral Malaria. *Infect Immun* 84: 329–338, 2015.

163. **Amante FH**, **Stanley AC**, **Randall LM**, **Zhou Y**, **Haque A**, **McSweeney K**, **Waters AP**, **Janse CJ**, **Good MF**, **Hill GR**, **Engwerda CR**. A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* 171: 548–559, 2007.

164. **Walther M**, **Jeffries D**, **Finney OC**, **Njie M**, **Ebonyi A**, **Deininger S**, **Lawrence E**, **Ngwa-Amambua A**, **Jayasooriya S**, **Cheeseman IH**, **Gomez-Escobar N**, **Okebe J**, **Conway DJ**, **Riley EM**. Distinct roles for FOXP3 and FOXP3 CD4 T cells in regulating cellular immunity to uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. *PLoS Pathog* 5: e1000364, 2009.

165. **Baird JK**, **Purnomo null**, **Basri H**, **Bangs MJ**, **Andersen EM**, **Jones TR**, **Masbar S**, **Harjosuwarno S**, **Subianto B**, **Arbani PR**. Age-specific prevalence of Plasmodium falciparum among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. *Am J Trop Med Hyg* 49: 707–719, 1993.

166. **Ly A**, **Hansen DS**. Development of B Cell Memory in Malaria. *Front Immunol* 10, 2019.

167. **Narum DL**, **Ogun SA**, **Thomas AW**, **Holder AA**. Immunization with parasite-derived apical membrane antigen 1 or passive immunization with a specific monoclonal antibody protects BALB/c mice against lethal Plasmodium yoelii yoelii YM blood-stage infection. *Infect Immun* 68: 2899–2906, 2000.

168. **Taylor-Robinson AW**, **Phillips RS**. B cells are required for the switch from Th1- to Th2-regulated immune responses to Plasmodium chabaudi chabaudi infection. *Infect Immun* 62: 2490–2498, 1994.

169. **Sabchareon A**, **Burnouf T**, **Ouattara D**, **Attanath P**, **Bouharoun-Tayoun H**, **Chantavanich P**, **Foucault C**, **Chongsuphajaisiddhi T**, **Druilhe P**. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 45: 297–308, 1991.

170. **Teo A**, **Feng G**, **Brown GV**, **Beeson JG**, **Rogerson SJ**. Functional Antibodies and Protection against Blood-stage Malaria. *Trends Parasitol* 32: 887–898, 2016.

171. **Chan J-A**, **Stanisic DI**, **Duffy MF**, **Robinson LJ**, **Lin E**, **Kazura JW**, **King CL**, **Siba PM**, **Fowkes FJ**, **Mueller I**, **Beeson JG**. Patterns of protective associations differ for antibodies to P. falciparum-infected erythrocytes and merozoites in immunity against malaria in children. *Eur J Immunol* 47: 2124–2136, 2017.

172. **Aucan C**, **Traoré Y**, **Fumoux F**, **Rihet P**. Familial correlation of immunoglobulin G subclass responses to Plasmodium falciparum antigens in Burkina Faso. *Infect Immun* 69: 996–1001, 2001.

173. **Garraud O**, **Mahanty S**, **Perraut R**. Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. *Trends Immunol* 24: 30–35, 2003.

174. **Kwenti TE**, **Kukwah TA**, **Kwenti TDB**, **Nyassa BR**, **Dilonga MH**, **Enow-Orock G**, **Tendongfor N**, **Anong ND**, **Wanji S**, **Njunda LA**, **Nkuo-Akenji T**. Comparative analysis of IgG and IgG subclasses against Plasmodium falciparum MSP-119 in children from five contrasting bioecological zones of Cameroon. *Malaria Journal* 18: 16, 2019.

175. **Metzger WG**, **Okenu DMN**, **Cavanagh DR**, **Robinson JV**, **Bojang KA**, **Weiss HA**, **McBride JS**, **Greenwood BM**, **Conway DJ**. Serum IgG3 to the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol* 25: 307–312, 2003.

176. **Aucan C**, **Traoré Y**, **Tall F**, **Nacro B**, **Traoré-Leroux T**, **Fumoux F**, **Rihet P**. High Immunoglobulin G2 (IgG2) and Low IgG4 Levels Are Associated with Human Resistance to Plasmodium falciparum Malaria. *Infect Immun* 68: 1252–1258, 2000.

177. **Groux H**, **Gysin J**. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of Plasmodium falciparum: functional role of IgG subclasses. *Res Immunol* 141: 529–542, 1990.

178. **Schreiber N**, **Brattig N**, **Evans J**, **Tsiri Agbenyega**, **Horstmann RD**, **May J**, **Klinkert M-Q**. Cerebral malaria is associated with IgG2 and IgG4 antibody responses to recombinant Plasmodium falciparum RIFIN antigen. *Microbes and Infection* 8: 1269–1276, 2006.

179. **Perlmann H**, **Helmby H**, **Hagstedt M**, **Carlson J**, **Larsson PH**, **Troye-Blomberg M**, **Perlmann P**. IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in Plasmodium falciparum malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria. *Clin Exp Immunol* 97: 284–292, 1994.

180. **Perlmann P**, **Perlmann H**, **Looareesuwan S**, **Krudsood S**, **Kano S**, **Matsumoto Y**, **Brittenham G**, **Troye-Blomberg M**, **Aikawa M**. Contrasting functions of IgG and IgE

antimalarial antibodies in uncomplicated and severe Plasmodium falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 62: 373–377, 2000.

181. **Kumsiri R**, **Troye-Blomberg M**, **Pattanapanyasat K**, **Krudsood S**, **Maneerat Y**. 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 Trop* 154: 25–33, 2016.

182. **Blackman MJ**, **Heidrich HG**, **Donachie S**, **McBride JS**, **Holder AA**. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. *J Exp Med* 172: 379–382, 1990.

183. **de Souza JB**, **Runglall M**, **Corran PH**, **Okell LC**, **Kumar S**, **Gowda DC**, **Couper KN**, **Riley EM**. Neutralization of malaria glycosylphosphatidylinositol in vitro by serum IgG from malaria-exposed individuals. *Infect Immun* 78: 3920–3929, 2010.

184. **Antwi-Baffour S**, **Kyeremeh R**, **Buabeng D**, **Adjei JK**, **Aryeh C**, **Kpentey G**, **Seidu MA**. Correlation of malaria parasitaemia with peripheral blood monocyte to lymphocyte ratio as indicator of susceptibility to severe malaria in Ghanaian children. *Malar J* 17: 419, 2018.

185. **Berens-Riha N**, **Kroidl I**, **Schunk M**, **Alberer M**, **Beissner M**, **Pritsch M**, **Kroidl A**, **Fröschl G**, **Hanus I**, **Bretzel G**, **von Sonnenburg F**, **Nothdurft HD**, **Löscher T**, **Herbinger K-H**. Evidence for significant influence of host immunity on changes in differential blood count during malaria. *Malar J* 13: 155, 2014.

186. **Dobbs KR**, **Embury P**, **Vulule J**, **Odada PS**, **Rosa BA**, **Mitreva M**, **Kazura JW**, **Dent AE**. Monocyte dysregulation and systemic inflammation during pediatric falciparum malaria. *JCI Insight* 2, 2017.

187. **Tangteerawatana P**, **Krudsood S**, **Kanchanakhan N**, **Troye-Blomberg M**, **Khusmith S**. Low monocyte to neutrophil ratio in peripheral blood associated with disease complication in primary Plasmodium falciparum infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 45: 517–530, 2014.

188. **Warimwe GM**, **Fletcher HA**, **Olotu A**, **Agnandji ST**, **Hill AVS**, **Marsh K**, **Bejon P**. Peripheral blood monocyte-to-lymphocyte ratio at study enrollment predicts efficacy of the RTS,S malaria vaccine: analysis of pooled phase II clinical trial data. *BMC Med* 11: 184, 2013.

189. **Shapouri-Moghaddam A**, **Mohammadian S**, **Vazini H**, **Taghadosi M**, **Esmaeili S-A**, **Mardani F**, **Seifi B**, **Mohammadi A**, **Afshari JT**, **Sahebkar A**. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233: 6425–6440, 2018.

190. **Chua CLL**, **Brown G**, **Hamilton JA**, **Rogerson S**, **Boeuf P**. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol* 29: 26–34, 2013.

191. **Auffray C**, **Sieweke MH**, **Geissmann F**. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27: 669–692, 2009.

192. **Guilliams M**, **Mildner A**, **Yona S**. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49: 595–613, 2018.

193. **Meuret G**, **Bammert J**, **Hoffmann G**. Kinetics of human monocytopoiesis. *Blood* 44: 801–816, 1974.

194. **Guilliams M**, **Scott CL**. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nature Reviews Immunology* 17: 451–460, 2017.

195. **Ortega-Pajares A**, **Rogerson SJ**. The Rough Guide to Monocytes in Malaria Infection. *Front Immunol* 9, 2018.

196. **Kapellos TS**, **Bonaguro L**, **Gemünd I**, **Reusch N**, **Saglam A**, **Hinkley ER**, **Schultze JL**. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol* 10, 2019.

197. **Patel AA**, **Zhang Y**, **Fullerton JN**, **Boelen L**, **Rongvaux A**, **Maini AA**, **Bigley V**, **Flavell RA**, **Gilroy DW**, **Asquith B**, **Macallan D**, **Yona S**. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 214: 1913–1923, 2017.

198. **Tak T**, **van Groenendael R**, **Pickkers P**, **Koenderman L**. Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *J Innate Immun* 9: 464–474, 2017.

199. **Mildner A**, **Schönheit J**, **Giladi A**, **David E**, **Lara-Astiaso D**, **Lorenzo-Vivas E**, **Paul F**, **Chappell-Maor L**, **Priller J**, **Leutz A**, **Amit I**, **Jung S**. Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBPβ Transcription Factor Dependence of Ly6C- Cells. *Immunity* 46: 849-862.e7, 2017.

200. **Ginhoux F**, **Greter M**, **Leboeuf M**, **Nandi S**, **See P**, **Gokhan S**, **Mehler MF**, **Conway SJ**, **Ng LG**, **Stanley ER**, **Samokhvalov IM**, **Merad M**. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330: 841–845, 2010.

201. **Mildner A**, **Schmidt H**, **Nitsche M**, **Merkler D**, **Hanisch U-K**, **Mack M**, **Heikenwalder M**, **Brück W**, **Priller J**, **Prinz M**. Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci* 10: 1544–1553, 2007.

202. **Hamers AAJ**, **Dinh HQ**, **Thomas GD**, **Marcovecchio P**, **Blatchley A**, **Nakao CS**, **Kim C**, **McSkimming C**, **Taylor AM**, **Nguyen AT**, **McNamara CA**, **Hedrick CC**. Human Monocyte Heterogeneity as Revealed by High-Dimensional Mass Cytometry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39: 25–36, 2019.

203. **Roussel M**, **Ferrell PB**, **Greenplate AR**, **Lhomme F**, **Le Gallou S**, **Diggins KE**, **Johnson DB**, **Irish JM**. Mass cytometry deep phenotyping of human mononuclear phagocytes and myeloid-derived suppressor cells from human blood and bone marrow. *J Leukoc Biol* 102: 437–447, 2017.

204. **Villani A-C**, **Satija R**, **Reynolds G**, **Sarkizova S**, **Shekhar K**, **Fletcher J**, **Griesbeck M**, **Butler A**, **Zheng S**, **Lazo S**, **Jardine L**, **Dixon D**, **Stephenson E**, **Nilsson E**,

Grundberg I, **McDonald D**, **Filby A**, **Li W**, **De Jager PL**, **Rozenblatt-Rosen O**, **Lane AA**, **Haniffa M**, **Regev A**, **Hacohen N**. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science* 356, 2017.

205. **Yáñez A**, **Coetzee SG**, **Olsson A**, **Muench DE**, **Berman BP**, **Hazelett DJ**, **Salomonis N**, **Grimes HL**, **Goodridge HS**. Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity* 47: 890-902.e4, 2017.

206. **Wong KL**, **Tai JJ-Y**, **Wong W-C**, **Han H**, **Sem X**, **Yeap W-H**, **Kourilsky P**, **Wong S-C**. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118: e16-31, 2011.

207. **Ingersoll MA**, **Spanbroek R**, **Lottaz C**, **Gautier EL**, **Frankenberger M**, **Hoffmann R**, **Lang R**, **Haniffa M**, **Collin M**, **Tacke F**, **Habenicht AJR**, **Ziegler-Heitbrock L**, **Randolph GJ**. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115: e10-19, 2010.

208. **Passlick B**, **Flieger D**, **Ziegler-Heitbrock HW**. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527–2534, 1989.

209. **Skrzeczyńska-Moncznik J**, **Bzowska M**, **Loseke S**, **Grage-Griebenow E**, **Zembala M**, **Pryjma J**. Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* 67: 152–159, 2008.

210. **Cros J**, **Cagnard N**, **Woollard K**, **Patey N**, **Zhang S-Y**, **Senechal B**, **Puel A**, **Biswas SK**, **Moshous D**, **Picard C**, **Jais J-P**, **D'Cruz D**, **Casanova J-L**, **Trouillet C**, **Geissmann F**. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375–386, 2010.

211. **Thomas G**, **Tacke R**, **Hedrick CC**, **Hanna RN**. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35: 1306–1316, 2015.

212. **Niewold P**, **Cohen A**, **van Vreden C**, **Getts DR**, **Grau GE**, **King NJC**. Experimental severe malaria is resolved by targeting newly-identified monocyte subsets using immune-modifying particles combined with artesunate. *Communications Biology* 1: 1–13, 2018.

213. **Tacke F**, **Alvarez D**, **Kaplan TJ**, **Jakubzick C**, **Spanbroek R**, **Llodra J**, **Garin A**, **Liu J**, **Mack M**, **van Rooijen N**, **Lira SA**, **Habenicht AJ**, **Randolph GJ**. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 117: 185–194, 2007.

214. **Maffei M**, **Funicello M**, **Vottari T**, **Gamucci O**, **Costa M**, **Lisi S**, **Viegi A**, **Ciampi O**, **Bardi G**, **Vitti P**, **Pinchera A**, **Santini F**. The obesity and inflammatory marker haptoglobin attracts monocytes via interaction with chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2). *BMC Biology* 7: 87, 2009.

215. **Sheel M**, **Engwerda CR**. The diverse roles of monocytes in inflammation caused by protozoan parasitic diseases. *Trends Parasitol* 28: 408–416, 2012.

216. **Terrazas C**, **Varikuti S**, **Oghumu S**, **Steinkamp HM**, **Ardic N**, **Kimble J**, **Nakhasi H**, **Satoskar AR**. Ly6Chi inflammatory monocytes promote susceptibility to Leishmania donovani infection. *Sci Rep* 7: 14693, 2017.

217. **Naert G**, **Rivest S**. Age-related changes in synaptic markers and monocyte subsets link the cognitive decline of APP(Swe)/PS1 mice. *Front Cell Neurosci* 6: 51, 2012.

218. **Castaño D**, **García LF**, **Rojas M**. Increased frequency and cell death of CD16+ monocytes with Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 91: 348–360, 2011.

219. **Skrzeczyñska J**, **Kobylarz K**, **Hartwich Z**, **Zembala M**, **Pryjma J**. CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand J Immunol* 55: 629–638, 2002.

220. **Azeredo EL**, **Neves-Souza PC**, **Alvarenga AR**, **Reis SRNI**, **Torrentes-Carvalho A**, **Zagne S-MO**, **Nogueira RMR**, **Oliveira-Pinto LM**, **Kubelka CF**. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology* 130: 202–216, 2010.

221. **Han J**, **Wang B**, **Han N**, **Zhao Y**, **Song C**, **Feng X**, **Mao Y**, **Zhang F**, **Zhao H**, **Zeng H**. CD14(high)CD16(+) rather than CD14(low)CD16(+) monocytes correlate with disease progression in chronic HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52: 553–559, 2009.

222. **Zhang J-Y**, **Zou Z-S**, **Huang A**, **Zhang Z**, **Fu J-L**, **Xu X-S**, **Chen L-M**, **Li B-S**, **Wang F-S**. Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One* 6: e17484, 2011.

223. **Moniuszko M**, **Bodzenta-Lukaszyk A**, **Kowal K**, **Lenczewska D**, **Dabrowska M**. Enhanced frequencies of CD14++CD16+, but not CD14+CD16+, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin Immunol* 130: 338–346, 2009.

224. **Urra X**, **Villamor N**, **Amaro S**, **Gómez-Choco M**, **Obach V**, **Oleaga L**, **Planas AM**, **Chamorro A**. Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 994–1002, 2009.

225. **Hou N**, **Jiang N**, **Zou Y**, **Piao X**, **Liu S**, **Li S**, **Chen Q**. Down-Regulation of Tim-3 in Monocytes and Macrophages in Plasmodium Infection and Its Association with Parasite Clearance. *Front Microbiol* 8: 1431, 2017.

226. **Teirlinck AC**, **Roestenberg M**, **Bijker EM**, **Hoffman SL**, **Sauerwein RW**, **Scholzen A**. Plasmodium falciparum Infection of Human Volunteers Activates Monocytes and CD16+ Dendritic Cells and Induces Upregulation of CD16 and CD1c Expression. *Infect Immun* 83: 3732–3739, 2015.

227. **Chimma P**, **Roussilhon C**, **Sratongno P**, **Ruangveerayuth R**, **Pattanapanyasat K**, **Pérignon J-L**, **Roberts DJ**, **Druilhe P**. A Distinct Peripheral Blood Monocyte Phenotype Is Associated with Parasite Inhibitory Activity in Acute Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. *PLoS Pathog* 5, 2009.

228. **Jaworowski A**, **Kamwendo DD**, **Ellery P**, **Sonza S**, **Mwapasa V**, **Tadesse E**, **Molyneux ME**, **Rogerson SJ**, **Meshnick SR**, **Crowe SM**. CD16+ monocyte subset preferentially harbors HIV-1 and is expanded in pregnant Malawian women with Plasmodium falciparum malaria and HIV-1 infection. *J Infect Dis* 196: 38–42, 2007.

229. **Antonelli LRV**, **Leoratti FMS**, **Costa PAC**, **Rocha BC**, **Diniz SQ**, **Tada MS**, **Pereira DB**, **Teixeira-Carvalho A**, **Golenbock DT**, **Gonçalves R**, **Gazzinelli RT**. The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute Plasmodium vivax malaria. *PLoS Pathog* 10: e1004393, 2014.

230. **Zhou J**, **Feng G**, **Beeson J**, **Hogarth PM**, **Rogerson SJ**, **Yan Y**, **Jaworowski A**. CD14(hi)CD16+ monocytes phagocytose antibody-opsonised Plasmodium falciparum infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Med* 13: 154, 2015.

231. **Ogonda LA**, **Orago ASS**, **Otieno MF**, **Adhiambo C**, **Otieno W**, **Stoute JA**. The levels of CD16/Fc gamma receptor IIIA on CD14+ CD16+ monocytes are higher in children with severe Plasmodium falciparum anemia than in children with cerebral or uncomplicated malaria. *Infect Immun* 78: 2173–2181, 2010.

232. **Sponaas A-M**, **Freitas do Rosario AP**, **Voisine C**, **Mastelic B**, **Thompson J**, **Koernig S**, **Jarra W**, **Renia L**, **Mauduit M**, **Potocnik AJ**, **Langhorne J**. Migrating monocytes recruited to the spleen play an important role in control of blood stage malaria. *Blood* 114: 5522–5531, 2009.

233. **Pai S**, **Qin J**, **Cavanagh L**, **Mitchell A**, **El-Assaad F**, **Jain R**, **Combes V**, **Hunt NH**, **Grau GER**, **Weninger W**. Real-Time Imaging Reveals the Dynamics of Leukocyte Behaviour during Experimental Cerebral Malaria Pathogenesis. *PLoS Pathog* 10, 2014.

234. **Schumak B**, **Klocke K**, **Kuepper JM**, **Biswas A**, **Djie-Maletz A**, **Limmer A**, **van Rooijen N**, **Mack M**, **Hoerauf A**, **Dunay IR**. Specific depletion of Ly6C(hi) inflammatory monocytes prevents immunopathology in experimental cerebral malaria. *PLoS One* 10: e0124080, 2015.

235. **Hirako IC**, **Ataide MA**, **Faustino L**, **Assis PA**, **Sorensen EW**, **Ueta H**, **Araújo NM**, **Menezes GB**, **Luster AD**, **Gazzinelli RT**. Splenic differentiation and emergence of CCR5+CXCL9+CXCL10+ monocyte-derived dendritic cells in the brain during cerebral malaria. *Nat Commun* 7: 13277, 2016.

236. **Lagassé HAD**, **Anidi IU**, **Craig JM**, **Limjunyawong N**, **Poupore AK**, **Mitzner W**, **Scott AL**. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. *J Leukoc Biol* 99: 659–671, 2016.

237. **Wilson KD**, **Stutz SJ**, **Ochoa LF**, **Valbuena GA**, **Cravens PD**, **Dineley KT**, **Vargas G**, **Stephens R**. Behavioural and neurological symptoms accompanied by cellular neuroinflammation in IL-10-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi. *Malar J* 15: 428, 2016.

238. **Gordon S**. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23–35, 2003.

239. **Mantovani A**, **Sica A**, **Sozzani S**, **Allavena P**, **Vecchi A**, **Locati M**. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25: 677–686, 2004.

240. **Orekhov AN**, **Orekhova VA**, **Nikiforov NG**, **Myasoedova VA**, **Grechko AV**, **Romanenko EB**, **Zhang D**, **Chistiakov DA**. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus* 3, 2019.

241. **Mosser DM**, **Edwards JP**. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* 8: 958–969, 2008.

242. **Mosser DM**. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73: 209–212, 2003.

243. **Klinkhamhom A**, **Glaharn S**, **Srisook C**, **Ampawong S**, **Krudsood S**, **Ward SA**, **Viriyavejakul P**. M1 macrophage features in severe Plasmodium falciparum malaria patients with pulmonary oedema. *Malar J* 19: 182, 2020. doi: 10.1186/s12936-020-03254-0.

244. **Boyer JF**, **Balard P**, **Authier H**, **Faucon B**, **Bernad J**, **Mazières B**, **Davignon J-L**, **Cantagrel A**, **Pipy B**, **Constantin A**. Tumor necrosis factor alpha and adalimumab differentially regulate CD36 expression in human monocytes. *Arthritis Res Ther* 9: R22, 2007.

245. **Berry A**, **Balard P**, **Coste A**, **Olagnier D**, **Lagane C**, **Authier H**, **Benoit-Vical F**, **Lepert J-C**, **Séguéla J-P**, **Magnaval J-F**, **Chambon P**, **Metzger D**, **Desvergne B**, **Wahli W**, **Auwerx J**, **Pipy B**. IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPARgamma activation. *Eur J Immunol* 37: 1642–1652, 2007.

246. **Stein M**, **Keshav S**, **Harris N**, **Gordon S**. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176: 287–292, 1992.

247. **McGilvray ID**, **Serghides L**, **Kapus A**, **Rotstein OD**, **Kain KC**. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood* 96: 3231–3240, 2000.

248. **Rey A**, **Quartulli F**, **Escoubet L**, **Sozzani P**, **Caput D**, **Ferrara P**, **Pipy B**. IL-13 induces serine phosphorylation of cPLA2 in mouse peritoneal macrophages leading to arachidonic acid and PGE2 production and blocks the zymosan-induced serine phosphorylation of cPLA2 and eicosanoid production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1440: 183–193, 1999.

249. **Escoubet-Lozach L**, **M'Rini C**, **Rey A**, **Béraud M**, **Lepert JC**, **Courtade M**, **Frisach MF**, **Pipy B**. Increased expression of cytosolic phospholipase A2, 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein in rat peritoneal macrophages during ovalbumin-induced sensitization. *Clin Exp Allergy* 31: 1094–1104, 2001.

250. **Huang JT**, **Welch JS**, **Ricote M**, **Binder CJ**, **Willson TM**, **Kelly C**, **Witztum JL**, **Funk CD**, **Conrad D**, **Glass CK**. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400: 378–382, 1999.

251. **Besnard A-G**, **Guabiraba R**, **Niedbala W**, **Palomo J**, **Reverchon F**, **Shaw TN**, **Couper KN**, **Ryffel B**, **Liew FY**. IL-33-mediated protection against experimental cerebral malaria is linked to induction of type 2 innate lymphoid cells, M2 macrophages and regulatory T cells. *PLoS Pathog* 11: e1004607, 2015.

252. **Benoit M**, **Desnues B**, **Mege J-L**. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* 181: 3733–3739, 2008.

253. **Tabas I**. Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis: Consequences on Plaque Progression and the Role of Endoplasmic Reticulum Stress. *Antioxid Redox Signal* 11: 2333–2339, 2009.

254. **Tebo AE**, **Kremsner PG**, **Luty AJF**. Fcγ receptor-mediated phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in vitro. *Clin Exp Immunol* 130: 300–306, 2002.

255. **Osier FH**, **Feng G**, **Boyle MJ**, **Langer C**, **Zhou J**, **Richards JS**, **McCallum FJ**, **Reiling L**, **Jaworowski A**, **Anders RF**, **Marsh K**, **Beeson JG**. Opsonic phagocytosis of Plasmodium falciparum merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med* 12: 108, 2014.

256. **Ayi K**, **Patel SN**, **Serghides L**, **Smith TG**, **Kain KC**. Nonopsonic Phagocytosis of Erythrocytes Infected with Ring-Stage Plasmodium falciparum. *Infection and Immunity* 73: 2559–2563, 2005.

257. **Patel SN**, **Serghides L**, **Smith TG**, **Febbraio M**, **Silverstein RL**, **Kurtz TW**, **Pravenec M**, **Kain KC**. CD36 mediates the phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by rodent macrophages. *J Infect Dis* 189: 204–213, 2004.

258. **Smith TG**, **Serghides L**, **Patel SN**, **Febbraio M**, **Silverstein RL**, **Kain KC**. CD36-mediated nonopsonic phagocytosis of erythrocytes infected with stage I and IIA gametocytes of Plasmodium falciparum. *Infect Immun* 71: 393–400, 2003.

259. **Aubouy A**, **Olagnier D**, **Bertin G**, **Ezinmegnon S**, **Majorel C**, **Mimar S**, **Massougbodji A**, **Deloron P**, **Pipy B**, **Coste A**. Nrf2-driven CD36 and HO-1 gene expression in circulating monocytes correlates with favourable clinical outcome in pregnancy-associated malaria. *Malar J* 14: 358, 2015.

260. **Cabrera A**, **Neculai D**, **Kain KC**. CD36 and malaria: friends or foes? A decade of data provides some answers. *Trends Parasitol* 30: 436–444, 2014.

261. **Gowda NM**, **Wu X**, **Kumar S**, **Febbraio M**, **Gowda DC**. CD36 Contributes to Malaria Parasite-Induced Pro-Inflammatory Cytokine Production and NK and T Cell Activation by Dendritic Cells. *PLOS ONE* 8: e77604, 2013.

262. **Olagnier D**, **Lavergne R-A**, **Meunier E**, **Lefèvre L**, **Dardenne C**, **Aubouy A**, **Benoit-Vical F**, **Ryffel B**, **Coste A**, **Berry A**, **Pipy B**. Nrf2, a PPARγ alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. *PLoS Pathog* 7: e1002254, 2011.

263. **Robinson BA**, **Welch TL**, **Smith JD**. Widespread functional specialization of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 family members to bind CD36 analysed across a parasite genome. *Mol Microbiol* 47: 1265–1278, 2003.

264. **Serghides L**, **Smith TG**, **Patel SN**, **Kain KC**. CD36 and malaria: friends or foes? *Trends Parasitol* 19: 461–469, 2003.

265. **Thylur RP**, **Wu X**, **Gowda NM**, **Punnath K**, **Neelgund SE**, **Febbraio M**, **Gowda DC**. CD36 receptor regulates malaria-induced immune responses primarily at early blood stage infection contributing to parasitemia control and resistance to mortality. *J Biol Chem* 292: 9394–9408, 2017.

266. **Febbraio M**, **Hajjar DP**, **Silverstein RL**. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108: 785–791, 2001.

267. **Dawson DW**, **Pearce SFA**, **Zhong R**, **Silverstein RL**, **Frazier WA**, **Bouck NP**. CD36 Mediates the In Vitro Inhibitory Effects of Thrombospondin-1 on Endothelial Cells. *J Cell Biol* 138: 707–717, 1997.

268. **Becker J**, **Delayre-Orthez C**, **Frossard N**, **Pons F**. Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases? *Fundam Clin Pharmacol* 20: 429–447, 2006.

269. **Ricote M**, **Li AC**, **Willson TM**, **Kelly CJ**, **Glass CK**. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79–82, 1998.

270. **Krey G**, **Braissant O**, **L'Horset F**, **Kalkhoven E**, **Perroud M**, **Parker MG**, **Wahli W**. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 11: 779–791, 1997.

271. **Boggild AK**, **Krudsood S**, **Patel SN**, **Serghides L**, **Tangpukdee N**, **Katz K**, **Wilairatana P**, **Liles WC**, **Looareesuwan S**, **Kain KC**. Use of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as adjunctive treatment for Plasmodium falciparum malaria: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 49: 841–849, 2009.

272. **Serghides L**, **Patel SN**, **Ayi K**, **Lu Z**, **Gowda DC**, **Liles WC**, **Kain KC**. Rosiglitazone modulates innate immune responses to Plasmodium falciparum and improves outcome in experimental cerebral malaria. *J Infect Dis* 199: 1536–1545, 2009.

273. **Lehmann JM**, **Lenhard JM**, **Oliver BB**, **Ringold GM**, **Kliewer SA**. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272: 3406–3410, 1997.

274. **D'Archivio M**, **Scazzocchio B**, **Filesi C**, **Varì R**, **Maggiorella MT**, **Sernicola L**, **Santangelo C**, **Giovannini C**, **Masella R**. Oxidised LDL up-regulate CD36 expression by the Nrf2 pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *FEBS Lett* 582: 2291–2298, 2008.

275. **Ishii T**, **Itoh K**, **Ruiz E**, **Leake DS**, **Unoki H**, **Yamamoto M**, **Mann GE**. Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal. *Circ Res* 94: 609–616, 2004.

276. **Maruyama A**, **Tsukamoto S**, **Nishikawa K**, **Yoshida A**, **Harada N**, **Motojima K**, **Ishii T**, **Nakane A**, **Yamamoto M**, **Itoh K**. Nrf2 regulates the alternative first exons of CD36 in macrophages through specific antioxidant response elements. *Arch Biochem Biophys* 477: 139–145, 2008.

277. **Kobayashi A**, **Kang M-I**, **Okawa H**, **Ohtsuji M**, **Zenke Y**, **Chiba T**, **Igarashi K**, **Yamamoto M**. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* 24: 7130–7139, 2004.

278. **Kobayashi M**, **Yamamoto M**. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* 46: 113–140, 2006.

279. **Kobayashi EH**, **Suzuki T**, **Funayama R**, **Nagashima T**, **Hayashi M**, **Sekine H**, **Tanaka N**, **Moriguchi T**, **Motohashi H**, **Nakayama K**, **Yamamoto M**. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* 7: 11624, 2016.

280. **Serghides L**, **Crandall I**, **Hull E**, **Kain KC**. The Plasmodium falciparum-CD36 interaction is modified by a single amino acid substitution in CD36. *Blood* 92: 1814–1819, 1998.

281. **Eda S**, **Sherman IW**. Cytoadherence of malaria-infected red blood cells involves exposure of phosphatidylserine. *Cell Physiol Biochem* 12: 373–384, 2002.

282. **Sherman IW**, **Prudhomme J**, **Tait JF**. Altered membrane phospholipid asymmetry in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Parasitol Today* 13: 242–243, 1997.

283. **Ho M**, **White NJ**. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol* 276: C1231-1242, 1999.

284. **MacPherson GG**, **Warrell MJ**, **White NJ**, **Looareesuwan S**, **Warrell DA**. Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* 119: 385–401, 1985.

285. **Ponsford MJ**, **Medana IM**, **Prapansilp P**, **Hien TT**, **Lee SJ**, **Dondorp AM**, **Esiri MM**, **Day NPJ**, **White NJ**, **Turner GDH**. Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *J Infect Dis* 205: 663–671, 2012.

286. **Franke-Fayard B**, **Janse CJ**, **Cunha-Rodrigues M**, **Ramesar J**, **Büscher P**, **Que I**, **Löwik C**, **Voshol PJ**, **den Boer MAM**, **van Duinen SG**, **Febbraio M**, **Mota MM**, **Waters AP**. Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11468–11473, 2005.

287. **Rogerson SJ**, **Tembenu R**, **Dobaño C**, **Plitt S**, **Taylor TE**, **Molyneux ME**. Cytoadherence characteristics of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg* 61: 467–472, 1999.

288. **Serghides L**, **McDonald CR**, **Lu Z**, **Friedel M**, **Cui C**, **Ho KT**, **Mount HTJ**, **Sled JG**, **Kain KC**. PPARγ Agonists Improve Survival and Neurocognitive Outcomes in Experimental Cerebral Malaria and Induce Neuroprotective Pathways in Human Malaria. *PLoS Pathog* 10, 2014.

289. **Cunha-Rodrigues M**, **Portugal S**, **Febbraio M**, **Mota MM**. Bone marrow chimeric mice reveal a dual role for CD36 in Plasmodium berghei ANKA infection. *Malar J* 6: 32, 2007.

290. **Klotz C**, **Frevert U**. Plasmodium yoelii sporozoites modulate cytokine profile and induce apoptosis in murine Kupffer cells. *Int J Parasitol* 38: 1639–1650, 2008.

291. **Tavares J**, **Formaglio P**, **Thiberge S**, **Mordelet E**, **Van Rooijen N**, **Medvinsky A**, **Ménard R**, **Amino R**. Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J Exp Med* 210: 905–915, 2013.

292. **Ayi K**, **Lu Z**, **Serghides L**, **Ho JM**, **Finney C**, **Wang JCY**, **Liles WC**, **Kain KC**. CD47-SIRPα Interactions Regulate Macrophage Uptake of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes and Clearance of Malaria In Vivo. *Infect Immun* 84: 2002–2011, 2016.

293. **Fernandez-Arias C**, **Lopez JP**, **Hernandez-Perez JN**, **Bautista-Ojeda MD**, **Branch O**, **Rodriguez A**. Malaria inhibits surface expression of complement receptor 1 in monocytes/macrophages, causing decreased immune complex internalization. *J Immunol* 190: 3363–3372, 2013.

294. **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* 182: 409–418, 1995.

295. **Tiendrebeogo RW**, **Adu B**, **Singh SK**, **Dziegiel MH**, **Nébié I**, **Sirima SB**, **Christiansen M**, **Dodoo D**, **Theisen M**. Antibody-Dependent Cellular Inhibition Is Associated With Reduced Risk Against Febrile Malaria in a Longitudinal Cohort Study Involving Ghanaian Children. *Open Forum Infect Dis* 2: ofv044, 2015.

296. **Roussilhon C**, **Bang G**, **Bastaert F**, **Solhonne B**, **Garcia-Verdugo I**, **Peronet R**, **Druilhe P**, **Sakuntabhai A**, **Mecheri S**, **Sallenave J-M**. The antimicrobial molecule trappin-2/elafin has anti-parasitic properties and is protective in vivo in a murine model of cerebral malaria. *Sci Rep* 7, 2017.

297. **Hirako IC**, **Gallego-Marin C**, **Ataide MA**, **Andrade WA**, **Gravina H**, **Rocha BC**, **de Oliveira RB**, **Pereira DB**, **Vinetz J**, **Diamond B**, **Ram S**, **Golenbock DT**, **Gazzinelli RT**. DNA-Containing Immunocomplexes Promote Inflammasome Assembly and Release of Pyrogenic Cytokines by CD14+ CD16+ CD64high CD32low Inflammatory Monocytes from Malaria Patients. *mBio* 6: e01605-01615, 2015.

298. **Krishnegowda G**, **Hajjar AM**, **Zhu J**, **Douglass EJ**, **Uematsu S**, **Akira S**, **Woods AS**, **Gowda DC**. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of Plasmodium falciparum: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 280: 8606–8616, 2005.

299. **McCall MBB**, **Netea MG**, **Hermsen CC**, **Jansen T**, **Jacobs L**, **Golenbock D**, **van der Ven AJAM**, **Sauerwein RW**. Plasmodium falciparum infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. *J Immunol* 179: 162–171, 2007.

300. **Schofield L**, **Novakovic S**, **Gerold P**, **Schwarz RT**, **McConville MJ**, **Tachado SD**. Glycosylphosphatidylinositol toxin of Plasmodium up-regulates intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin expression in vascular endothelial cells and increases leukocyte and parasite cytoadherence via tyrosine kinase-dependent signal transduction. *J Immunol* 156: 1886–1896, 1996.

301. **Amodu OK**, **Adeyemo AA**, **Olumese PE**, **Gbadegesin RA**. Intraleucocytic malaria pigment and clinical severity of malaria in children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92: 54–56, 1998.

302. **Birhanu M**, **Asres Y**, **Adissu W**, **Yemane T**, **Zemene E**, **Gedefaw L**. Hematological Parameters and Hemozoin-Containing Leukocytes and Their Association with Disease Severity among Malaria Infected Children: A Cross-Sectional Study at Pawe General Hospital, Northwest Ethiopia. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2017, 2017.

303. **Biswas S**, **Karmarkar MG**, **Sharma YD**. Antibodies detected against Plasmodium falciparum haemozoin with inhibitory properties to cytokine production. *FEMS Microbiol Lett* 194: 175–179, 2001.

304. **Orjih AU**. Maturation of Plasmodium falciparum in multiply infected erythrocytes and the potential role in malaria pathogenesis. *Parasitol Res* 113: 4045–4056, 2014.

305. **Barrera V**, **Skorokhod OA**, **Baci D**, **Gremo G**, **Arese P**, **Schwarzer E**. Host fibrinogen stably bound to hemozoin rapidly activates monocytes via TLR-4 and CD11b/CD18-integrin: a new paradigm of hemozoin action. *Blood* 117: 5674–5682, 2011.

306. **Abugri J**, **Tetteh JKA**, **Oseni LA**, **Mensah-Brown HE**, **Delimini RK**, **Obuobi DO**, **Akanmori BD**. Age-related pattern and monocyte-acquired haemozoin associated production of erythropoietin in children with severe malarial anaemia in Ghana. *BMC Res Notes* 7: 551, 2014.

307. **Debs S**, **Cohen A**, **Hosseini-Beheshti E**, **Chimini G**, **Hunt NH**, **Grau GER**. Interplay of extracellular vesicles and other players in cerebral malaria pathogenesis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1863: 325–331, 2019.

308. **Mantel P-Y**, **Hoang AN**, **Goldowitz I**, **Potashnikova D**, **Hamza B**, **Vorobjev I**, **Ghiran I**, **Toner M**, **Irimia D**, **Ivanov AR**, **Barteneva N**, **Marti M**. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe* 13: 521–534, 2013.

309. **Mantel P-Y**, **Marti M**. The role of extracellular vesicles in Plasmodium and other protozoan parasites. *Cell Microbiol* 16: 344–354, 2014.

310. **Sampaio NG**, **Cheng L**, **Eriksson EM**. The role of extracellular vesicles in malaria biology and pathogenesis. *Malaria Journal* 16: 245, 2017.

311. **Schroder K**, **Sweet MJ**, **Hume DA**. Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211: 511–524, 2006.

312. **Muniz-Junqueira MI**, **dos Santos-Neto LL**, **Tosta CE**. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the ability of monocytes and lymphocytes to destroy intraerythrocytic Plasmodium falciparum in vitro. *Cell Immunol* 208: 73–79, 2001.

313. **Hernandez-Valladares M**, **Naessens J**, **Musoke AJ**, **Sekikawa K**, **Rihet P**, **Ole-Moiyoi OK**, **Busher P**, **Iraqi FA**. Pathology of Tnf-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi adami 408XZ. *Exp Parasitol* 114: 271–278, 2006.

314. **Prakash D**, **Fesel C**, **Jain R**, **Cazenave P-A**, **Mishra GC**, **Pied S**. Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis* 194: 198–207, 2006.

315. **Berry A**, **Chene G**, **Benoit-Vical F**, **Lepert JC**, **Bernad J**, **Marchou B**, **Séguéla JP**, **Magnaval JF**, **Pipy B**. Ex vivo and in vitro impairment of CD36 expression and tumor necrosis factor-alpha production in human monocytes in response to Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes. *J Parasitol* 91: 316–322, 2005.

316. **D'Ombrain MC**, **Voss TS**, **Maier AG**, **Pearce JA**, **Hansen DS**, **Cowman AF**, **Schofield L**. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1 specifically suppresses early production of host interferon-gamma. *Cell Host Microbe* 2: 130–138, 2007.

317. **Omer FM**, **de Souza JB**, **Corran PH**, **Sultan AA**, **Riley EM**. Activation of Transforming Growth Factor β by Malaria Parasite-derived Metalloproteinases and a Thrombospondin-like Molecule. *J Exp Med* 198: 1817–1827, 2003.

318. **Sampaio NG**, **Eriksson EM**, **Schofield L**. Plasmodium falciparum PfEMP1 Modulates Monocyte/Macrophage Transcription Factor Activation and Cytokine and Chemokine Responses. *Infect Immun* 86, 2018.

319. **Urban BC**, **Ferguson DJ**, **Pain A**, **Willcox N**, **Plebanski M**, **Austyn JM**, **Roberts DJ**. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells. *Nature* 400: 73–77, 1999.

320. **Urban BC**, **Willcox N**, **Roberts DJ**. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8750–8755, 2001.

321. **Han J**, **Hajjar DP**, **Tauras JM**, **Feng J**, **Gotto AM**, **Nicholson AC**. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* 275: 1241–1246, 2000.

322. **Rubic T**, **Lorenz RL**. Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc Res* 69: 527–535, 2006.

323. **Mandala WL**, **Msefula CL**, **Gondwe EN**, **Drayson MT**, **Molyneux ME**, **MacLennan CA**. Cytokine Profiles in Malawian Children Presenting with Uncomplicated Malaria, Severe Malarial Anemia, and Cerebral Malaria. *Clin Vaccine Immunol* 24, 2017.

324. **Thuma PE**, **van Dijk J**, **Bucala R**, **Debebe Z**, **Nekhai S**, **Kuddo T**, **Nouraie M**, **Weiss G**, **Gordeuk VR**. Distinct Clinical and Immunologic Profiles in Severe Malarial Anemia and Cerebral Malaria in Zambia. *J Infect Dis* 203: 211–219, 2011.

325. **Griffith JW**, **Sokol CL**, **Luster AD**. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32: 659–702, 2014.

326. **Pober JS**, **Cotran RS**. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70: 427–451, 1990.

327. **Jain V**, **Armah HB**, **Tongren JE**, **Ned RM**, **Wilson NO**, **Crawford S**, **Joel PK**, **Singh MP**, **Nagpal AC**, **Dash A**, **Udhayakumar V**, **Singh N**, **Stiles JK**. Plasma IP-10, apoptotic and angiogenic factors associated with fatal cerebral malaria in India. *Malar J* 7: 83, 2008.

328. **Wilson NO**, **Jain V**, **Roberts CE**, **Lucchi N**, **Joel PK**, **Singh MP**, **Nagpal AC**, **Dash AP**, **Udhayakumar V**, **Singh N**, **Stiles JK**. CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria. *Dis Markers* 30: 39–49, 2011.

329. **Campanella GSV**, **Tager AM**, **El Khoury JK**, **Thomas SY**, **Abrazinski TA**, **Manice LA**, **Colvin RA**, **Luster AD**. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 4814–4819, 2008.

330. **Miu J**, **Mitchell AJ**, **Müller M**, **Carter SL**, **Manders PM**, **McQuillan JA**, **Saunders BM**, **Ball HJ**, **Lu B**, **Campbell IL**, **Hunt NH**. Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol* 180: 1217–1230, 2008.

331. **Van den Steen PE**, **Deroost K**, **Van Aelst I**, **Geurts N**, **Martens E**, **Struyf S**, **Nie CQ**, **Hansen DS**, **Matthys P**, **Van Damme J**, **Opdenakker G**. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur J Immunol* 38: 1082–1095, 2008.

332. **Song L**, **Pachter JS**. Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 67: 78–89, 2004.

333. **Mantel P-Y**, **Hjelmqvist D**, **Walch M**, **Kharoubi-Hess S**, **Nilsson S**, **Ravel D**, **Ribeiro M**, **Grüring C**, **Ma S**, **Padmanabhan P**, **Trachtenberg A**, **Ankarklev J**, **Brancucci NM**, **Huttenhower C**, **Duraisingh MT**, **Ghiran I**, **Kuo WP**, **Filgueira L**,

Martinelli R, **Marti M**. Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nat Commun* 7: 12727, 2016.

334. **Sorensen EW**, **Lian J**, **Ozga AJ**, **Miyabe Y**, **Ji SW**, **Bromley SK**, **Mempel TR**, **Luster AD**. CXCL10 stabilizes T cell-brain endothelial cell adhesion leading to the induction of cerebral malaria. *JCI Insight* 3, 2018.

335. **Combes V**, **El-Assaad F**, **Faille D**, **Jambou R**, **Hunt NH**, **Grau GER**. Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. *Prog Neurobiol* 91: 140–151, 2010.

336. **Hunt NH**, **Golenser J**, **Chan-Ling T**, **Parekh S**, **Rae C**, **Potter S**, **Medana IM**, **Miu J**, **Ball HJ**. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol* 36: 569–582, 2006.

337. **Tan H-Y**, **Wang N**, **Li S**, **Hong M**, **Wang X**, **Feng Y**. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 2016.

338. **Percário S**, **Moreira DR**, **Gomes BAQ**, **Ferreira MES**, **Gonçalves ACM**, **Laurindo PSOC**, **Vilhena TC**, **Dolabela MF**, **Green MD**. Oxidative Stress in Malaria. *Int J Mol Sci* 13: 16346–16372, 2012.

339. **Martinez FO**, **Gordon S**. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6: 13, 2014.

340. **Clark IA**, **Hunt NH**. Evidence for reactive oxygen intermediates causing hemolysis and parasite death in malaria. *Infect Immun* 39: 1–6, 1983.

341. **Levander OA**, **Fontela R**, **Morris VC**, **Ager AL**. Protection against murine cerebral malaria by dietary-induced oxidative stress. *J Parasitol* 81: 99–103, 1995.

342. **Al Yaman FM**, **Mokela D**, **Genton B**, **Rockett KA**, **Alpers MP**, **Clark IA**. Association between serum levels of reactive nitrogen intermediates and coma in children with cerebral malaria in Papua New Guinea. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 270–273, 1996.

343. **Burgner D**, **Usen S**, **Rockett K**, **Jallow M**, **Ackerman H**, **Cervino A**, **Pinder M**, **Kwiatkowski DP**. Nucleotide and haplotypic diversity of the NOS2A promoter region and its relationship to cerebral malaria. *Hum Genet* 112: 379–386, 2003.

344. **Pino P**, **Vouldoukis I**, **Dugas N**, **Hassani-Loppion G**, **Dugas B**, **Mazier D**. Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1010: 582–586, 2003.

345. **Weiss G**, **Thuma PE**, **Biemba G**, **Mabeza G**, **Werner ER**, **Gordeuk VR**. Cerebrospinal fluid levels of biopterin, nitric oxide metabolites, and immune activation markers and the clinical course of human cerebral malaria. *J Infect Dis* 177: 1064–1068, 1998.

346. **Taylor AM**, **Day NPJ**, **Sinh DXT**, **Loc PP**, **Mai TTH**, **Chau TT**, **Phu NH**, **Hien TT**, **White NJ**. Reactive nitrogen intermediates and outcome in severe adult malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 92: 170–175, 1998.

347. **Alkaitis MS**, **Wang H**, **Ikeda AK**, **Rowley CA**, **MacCormick IJC**, **Chertow JH**, **Billker O**, **Suffredini AF**, **Roberts DJ**, **Taylor TE**, **Seydel KB**, **Ackerman HC**. Decreased Rate of Plasma Arginine Appearance in Murine Malaria May Explain Hypoargininemia in Children With Cerebral Malaria. *J Infect Dis* 214: 1840–1849, 2016.

348. **Anstey NM**, **Weinberg JB**, **Hassanali MY**, **Mwaikambo ED**, **Manyenga D**, **Misukonis MA**, **Arnelle DR**, **Hollis D**, **McDonald MI**, **Granger DL**. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med* 184: 557–567, 1996.

349. **Hobbs MR**, **Udhayakumar V**, **Levesque MC**, **Booth J**, **Roberts JM**, **Tkachuk AN**, **Pole A**, **Coon H**, **Kariuki S**, **Nahlen BL**, **Mwaikambo ED**, **Lal AL**, **Granger DL**, **Anstey NM**, **Weinberg JB**. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children. *Lancet* 360: 1468–1475, 2002.

350. **Lopansri BK**, **Anstey NM**, **Weinberg JB**, **Stoddard GJ**, **Hobbs MR**, **Levesque MC**, **Mwaikambo ED**, **Granger DL**. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet* 361: 676–678, 2003.

351. **Serghides L**, **Kim H**, **Lu Z**, **Kain DC**, **Miller C**, **Francis RC**, **Liles WC**, **Zapol WM**, **Kain KC**. Inhaled Nitric Oxide Reduces Endothelial Activation and Parasite Accumulation in the Brain, and Enhances Survival in Experimental Cerebral Malaria. *PLoS One* 6, 2011.

352. **Weinberg JB**, **Volkheimer AD**, **Rubach MP**, **Florence SM**, **Mukemba JP**, **Kalingonji AR**, **Langelier C**, **Chen Y**, **Bush M**, **Yeo TW**, **Granger DL**, **Anstey NM**, **Mwaikambo ED**. Monocyte polarization in children with falciparum malaria: relationship to nitric oxide insufficiency and disease severity. *Sci Rep* 6: 29151, 2016.

353. **Bergmark B**, **Bergmark R**, **Beaudrap PD**, **Boum Y**, **Mwanga-Amumpaire J**, **Carroll R**, **Zapol W**. Inhaled nitric oxide and cerebral malaria: basis of a strategy for buying time for pharmacotherapy. *Pediatr Infect Dis J* 31: e250-254, 2012.

354. **De Caterina R**, **Libby P**, **Peng HB**, **Thannickal VJ**, **Rajavashisth TB**, **Gimbrone MA**, **Shin WS**, **Liao JK**. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96: 60–68, 1995.

355. **Yeo TW**, **Lampah DA**, **Gitawati R**, **Tjitra E**, **Kenangalem E**, **McNeil YR**, **Darcy CJ**, **Granger DL**, **Weinberg JB**, **Lopansri BK**, **Price RN**, **Duffull SB**, **Celermajer DS**, **Anstey NM**. Recovery of Endothelial Function in Severe Falciparum Malaria: Relationship with Improvement in Plasma L-Arginine and Blood Lactate Concentrations. *J Infect Dis* 198: 602–608, 2008.

356. **Ong PK**, **Moreira AS**, **Daniel-Ribeiro CT**, **Frangos JA**, **Carvalho LJM**. Reversal of cerebrovascular constriction in experimental cerebral malaria by L-arginine. *Scientific Reports* 8: 15957, 2018.

357. **Dalko E**, **Genete D**, **Auger F**, **Dovergne C**, **Lambert C**, **Herbert F**, **Cazenave P-A**, **Roland J**, **Pied S**. Heme dampens T-cell sequestration by modulating glial cell responses during rodent cerebral malaria. *Brain Behav Immun* 58: 280–290, 2016.

358. **Postma NS**, **Mommers EC**, **Eling WM**, **Zuidema J**. Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharm World Sci* 18: 121–129, 1996.

359. **Isah MB**, **Ibrahim MA**. The role of antioxidants treatment on the pathogenesis of malarial infections: a review. *Parasitol Res* 113: 801–809, 2014.

360. **Becker K**, **Tilley L**, **Vennerstrom JL**, **Roberts D**, **Rogerson S**, **Ginsburg H**. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol* 34: 163–189, 2004.

361. **Kumar A**, **Barrett JP**, **Alvarez-Croda D-M**, **Stoica BA**, **Faden AI**, **Loane DJ**. NOX2 drives M1-like microglial/macrophage activation and neurodegeneration following experimental traumatic brain injury. *Brain Behav Immun* 58: 291–309, 2016.

362. **Das BS**, **Mohanty S**, **Mishra SK**, **Patnaik JK**, **Satpathy SK**, **Mohanty D**, **Bose TK**. Increased cerebrospinal fluid protein and lipid peroxidation products in patients with cerebral malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 85: 733–734, 1991.

363. **Medana IM**, **Mai NT**, **Day NP**, **Hien TT**, **Bethell D**, **Phu NH**, **Farrar J**, **White NJ**, **Turner GD**. Cellular stress and injury responses in the brains of adult Vietnamese patients with fatal Plasmodium falciparum malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 27: 421–433, 2001.

364. **Linares M**, **Marín-García P**, **Martínez-Chacón G**, **Pérez-Benavente S**, **Puyet A**, **Diez A**, **Bautista JM**. Glutathione peroxidase contributes with heme oxygenase-1 to redox balance in mouse brain during the course of cerebral malaria. *Biochim Biophys Acta* 1832: 2009–2018, 2013.

365. **Dumaswala UJ**, **Zhuo L**, **Mahajan S**, **Nair PN**, **Shertzer HG**, **Dibello P**, **Jacobsen DW**. Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C867-873, 2001.

366. **Müller S**. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol Microbiol* 53: 1291–1305, 2004.

367. **Ghashghaeinia M**, **Bobbala D**, **Wieder T**, **Koka S**, **Brück J**, **Fehrenbacher B**, **Röcken M**, **Schaller M**, **Lang F**, **Ghoreschi K**. Targeting glutathione by dimethylfumarate protects against experimental malaria by enhancing erythrocyte cell membrane scrambling. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C791-804, 2010.

368. **Kume A**, **Kasai S**, **Furuya H**, **Suzuki H**. α-Tocopheryl succinate-suppressed development of cerebral malaria in mice. *Parasitol Res* 117: 3177–3182, 2018.

369. **Thumwood CM**, **Hunt NH**, **Cowden WB**, **Clark IA**. Antioxidants can prevent cerebral malaria in Plasmodium berghei-infected mice. *Br J Exp Pathol* 70: 293–303, 1989.

370. **Vomund S**, **Schäfer A**, **Parnham MJ**, **Brüne B**, **von Knethen A**. Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. *Int J Mol Sci* 18, 2017.

371. **Buendia I**, **Michalska P**, **Navarro E**, **Gameiro I**, **Egea J**, **León R**. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther* 157: 84–104, 2016.

372. **Liu L**, **Locascio LM**, **Doré S**. Critical Role of Nrf2 in Experimental Ischemic Stroke. *Front Pharmacol* 10: 153, 2019.

373. **Thimmulappa RK**, **Lee H**, **Rangasamy T**, **Reddy SP**, **Yamamoto M**, **Kensler TW**, **Biswal S**. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest* 116: 984–995, 2006.

374. **Liu X**, **Zhang X**, **Ding Y**, **Zhou W**, **Tao L**, **Lu P**, **Wang Y**, **Hu R**. Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activity by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Induced NLRP3 Priming. *Antioxid Redox Signal* 26: 28–43, 2017.

375. **Chen X-L**, **Dodd G**, **Thomas S**, **Zhang X**, **Wasserman MA**, **Rovin BH**, **Kunsch C**. Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1862-1870, 2006.

376. **Kunze R**, **Urrutia A**, **Hoffmann A**, **Liu H**, **Helluy X**, **Pham M**, **Reischl S**, **Korff T**, **Marti HH**. Dimethyl fumarate attenuates cerebral edema formation by protecting the blood-brain barrier integrity. *Exp Neurol* 266: 99–111, 2015.

377. **Jeney V**, **Ramos S**, **Bergman M-L**, **Bechmann I**, **Tischer J**, **Ferreira A**, **Oliveira-Marques V**, **Janse CJ**, **Rebelo S**, **Cardoso S**, **Soares MP**. Control of Disease Tolerance to Malaria by Nitric Oxide and Carbon Monoxide. *Cell Reports* 8: 126–136, 2014.

378. **Mita-Mendoza NK**, **Magallon-Tejada A**, **Parmar P**, **Furtado R**, **Aldrich M**, **Saidi A**, **Taylor T**, **Smith J**, **Seydel K**, **Daily JP**. Dimethyl fumarate reduces TNF and Plasmodium falciparum induced brain endothelium activation in vitro. *Malar J* 19: 376, 2020.

379. **Luo B**, **Wang J**, **Liu Z**, **Shen Z**, **Shi R**, **Liu Y-Q**, **Liu Y**, **Jiang M**, **Wu Y**, **Zhang Z**. Phagocyte respiratory burst activates macrophage erythropoietin signalling to promote acute inflammation resolution. *Nat Commun* 7: 12177, 2016.

380. **McDonough A**, **Weinstein JR**. Neuroimmune Response in Ischemic Preconditioning. *Neurotherapeutics* 13: 748–761, 2016.

381. **Netea MG**, **Quintin J**, **van der Meer JWM**. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9: 355–361, 2011.

382. **Kaufmann E**, **Sanz J**, **Dunn JL**, **Khan N**, **Mendonça LE**, **Pacis A**, **Tzelepis F**, **Pernet E**, **Dumaine A**, **Grenier J-C**, **Mailhot-Léonard F**, **Ahmed E**, **Belle J**, **Besla R**, **Mazer B**, **King IL**, **Nijnik A**, **Robbins CS**, **Barreiro LB**, **Divangahi M**. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* 172: 176-190.e19, 2018.

383. **Arts RJW**, **Moorlag SJCFM**, **Novakovic B**, **Li Y**, **Wang S-Y**, **Oosting M**, **Kumar V**, **Xavier RJ**, **Wijmenga C**, **Joosten LAB**, **Reusken CBEM**, **Benn CS**, **Aaby P**, **Koopmans MP**, **Stunnenberg HG**, **van Crevel R**, **Netea MG**. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe* 23: 89-100.e5, 2018.

384. **Kleinnijenhuis J**, **Quintin J**, **Preijers F**, **Joosten LAB**, **Ifrim DC**, **Saeed S**, **Jacobs C**, **Loenhout J van**, **Jong D de**, **Stunnenberg HG**, **Xavier RJ**, **Meer JWM van der**, **Crevel R van**, **Netea MG**. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *PNAS* 109: 17537–17542, 2012.

385. **Bauer M**, **Weis S**, **Netea MG**, **Wetzker R**. Remembering Pathogen Dose: Long-Term Adaptation in Innate Immunity. *Trends Immunol* 39: 438–445, 2018.

386. **Franklin BS**, **Parroche P**, **Ataíde MA**, **Lauw F**, **Ropert C**, **de Oliveira RB**, **Pereira D**, **Tada MS**, **Nogueira P**, **da Silva LHP**, **Bjorkbacka H**, **Golenbock DT**, **Gazzinelli RT**. Malaria primes the innate immune response due to interferon-gamma induced enhancement of toll-like receptor expression and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5789–5794, 2009.

387. **Natoli G**, **Ostuni R**. Adaptation and memory in immune responses. *Nature Immunology* 20: 783–792, 2019.

388. **Day NP**, **Pham TD**, **Phan TL**, **Dinh XS**, **Pham PL**, **Ly VC**, **Tran TH**, **Nguyen TH**, **Bethell DB**, **Nguyan HP**, **Tran TH**, **White NJ**. Clearance kinetics of parasites and pigment-containing leukocytes in severe malaria. *Blood* 88: 4694–4700, 1996.

389. **Joice R**, **Nilsson SK**, **Montgomery J**, **Dankwa S**, **Egan E**, **Morahan B**, **Seydel KB**, **Bertuccini L**, **Alano P**, **Williamson KC**, **Duraisingh MT**, **Taylor TE**, **Milner DA**, **Marti M**. Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Sci Transl Med* 6: 244re5, 2014.

390. **Milner DA**, **Valim C**, **Carr RA**, **Chandak PB**, **Fosiko NG**, **Whitten R**, **Playforth KB**, **Seydel KB**, **Kamiza S**, **Molyneux ME**, **Taylor TE**. A histological method for quantifying Plasmodium falciparum in the brain in fatal paediatric cerebral malaria. *Malar J* 12: 191, 2013.

391. **Frita R**, **Carapau D**, **Mota MM**, **Hänscheid T**. In Vivo Hemozoin Kinetics after Clearance of Plasmodium berghei Infection in Mice. *Malar Res Treat* 2012: 373086, 2012.

392. **Morakote N**, **Justus DE**. Immunosuppression in malaria: effect of hemozoin produced by Plasmodium berghei and Plasmodium falciparum. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 86: 28–34, 1988.

393. **Pongponratn E**, **Turner GDH**, **Day NPJ**, **Phu NH**, **Simpson JA**, **Stepniewska K**, **Mai NTH**, **Viriyavejakul P**, **Looareesuwan S**, **Hien TT**, **Ferguson DJP**, **White NJ**. An ultrastructural study of the brain in fatal Plasmodium falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 69: 345–359, 2003.

394. **Craig A**, **Scherf A**. Molecules on the surface of the Plasmodium falciparum infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol* 115: 129–143, 2001.

395. **Gillrie MR**, **Lee K**, **Gowda DC**, **Davis SP**, **Monestier M**, **Cui L**, **Hien TT**, **Day NPJ**, **Ho M**. Plasmodium falciparum histones induce endothelial proinflammatory response and barrier dysfunction. *Am J Pathol* 180: 1028–1039, 2012.

396. **Hochman SE**, **Madaline TF**, **Wassmer SC**, **Mbale E**, **Choi N**, **Seydel KB**, **Whitten RO**, **Varughese J**, **Grau GER**, **Kamiza S**, **Molyneux ME**, **Taylor TE**, **Lee S**, **Milner DA**, **Kim K**. Fatal Pediatric Cerebral Malaria Is Associated with Intravascular Monocytes and Platelets That Are Increased with HIV Coinfection. *mBio* 6: e01390-01315, 2015.

397. **Medana IM**, **Turner GDH**. Human cerebral malaria and the blood–brain barrier. *International Journal for Parasitology* 36: 555–568, 2006.

398. **Turner GD**, **Ly VC**, **Nguyen TH**, **Tran TH**, **Nguyen HP**, **Bethell D**, **Wyllie S**, **Louwrier K**, **Fox SB**, **Gatter KC**, **Day NP**, **Tran TH**, **White NJ**, **Berendt AR**. Systemic endothelial activation occurs in both mild and severe malaria. Correlating dermal microvascular endothelial cell phenotype and soluble cell adhesion molecules with disease severity. *Am J Pathol* 152: 1477–1487, 1998.

399. **Capuccini B**, **Lin J**, **Talavera-López C**, **Khan SM**, **Sodenkamp J**, **Spaccapelo R**, **Langhorne J**. Transcriptomic profiling of microglia reveals signatures of cell activation and immune response, during experimental cerebral malaria. *Scientific Reports* 6: 39258, 2016.

400. **Varo R**, **Crowley VM**, **Sitoe A**, **Madrid L**, **Serghides L**, **Kain KC**, **Bassat Q**. Adjunctive therapy for severe malaria: a review and critical appraisal. *Malar J* 17: 47, 2018.

401. **Van den Steen PE**, **Geurts N**, **Deroost K**, **Van Aelst I**, **Verhenne S**, **Heremans H**, **Van Damme J**, **Opdenakker G**. Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 957–968, 2010.

402. **Hoffman SL**, **Rustama D**, **Punjabi NH**, **Surampaet B**, **Sanjaya B**, **Dimpudus AJ**, **McKee KT**, **Paleologo FP**, **Campbell JR**, **Marwoto H**. High-dose dexamethasone in quinine-treated patients with cerebral malaria: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 158: 325–331, 1988.

403. **Prasad K**, **Garner P**. Steroids for treating cerebral malaria. *Cochrane Database Syst Rev* : CD000972, 2000.

404. **Warrell DA**, **Looareesuwan S**, **Warrell MJ**, **Kasemsarn P**, **Intaraprasert R**, **Bunnag D**, **Harinasuta T**. Dexamethasone Proves Deleterious in Cerebral Malaria. *New England Journal of Medicine* 306: 313–319, 1982.

405. **Taylor TE**, **Molyneux ME**, **Wirima JJ**, **Borgstein A**, **Goldring JD**, **Hommel M**. Intravenous immunoglobulin in the treatment of paediatric cerebral malaria. *Clin Exp Immunol* 90: 357–362, 1992.

406. **Havlik I**, **Looareesuwan S**, **Vannaphan S**, **Wilairatana P**, **Krudsood S**, **Thuma PE**, **Kozbor D**, **Watanabe N**, **Kaneko Y**. Curdlan sulphate in human severe/cerebral Plasmodium falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99: 333–340, 2005.

407. **Havlik I**, **Rovelli S**, **Kaneko Y**. The effect of curdlan sulphate on in vitro growth of Plasmodium falciparum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88: 686–687, 1994.

408. **de Souza JB**, **Okomo U**, **Alexander ND**, **Aziz N**, **Owens BMJ**, **Kaur H**, **Jasseh M**, **Muangnoicharoen S**, **Sumariwalla PF**, **Warhurst DC**, **Ward SA**, **Conway DJ**, **Ulloa L**, **Tracey KJ**, **Foxwell BMJ**, **Kaye PM**, **Walther M**. Oral activated charcoal prevents experimental cerebral malaria in mice and in a randomized controlled clinical trial in man did not interfere with the pharmacokinetics of parenteral artesunate. *PLoS One* 5: e9867, 2010.

409. **Balachandar S**, **Katyal A**. Peroxisome proliferator activating receptor (PPAR) in cerebral malaria (CM): a novel target for an additional therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 483–498, 2011.

410. **Kapadia R**, **Yi J-H**, **Vemuganti R**. Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Front Biosci* 13: 1813–1826, 2008.

411. **Lehrke M**, **Lazar MA**. The many faces of PPARgamma. *Cell* 123: 993–999, 2005.

412. **Yi J-H**, **Park S-W**, **Brooks N**, **Lang BT**, **Vemuganti R**. PPARgamma agonist rosiglitazone is neuroprotective after traumatic brain injury via anti-inflammatory and anti-oxidative mechanisms. *Brain Res* 1244: 164–172, 2008.

413. **Varo R**, **Crowley VM**, **Sitoe A**, **Madrid L**, **Serghides L**, **Bila R**, **Mucavele H**, **Mayor A**, **Bassat Q**, **Kain KC**. Safety and tolerability of adjunctive rosiglitazone treatment for children with uncomplicated malaria. *Malar J* 16, 2017.

414. **Centro de Investigacao em Saude de Manhica**. Rosiglitazone Adjunctive Therapy for Severe Malaria in Children [Online]. clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02694874.

415. **van Hensbroek MB**, **Palmer A**, **Onyiorah E**, **Schneider G**, **Jaffar S**, **Dolan G**, **Memming H**, **Frenkel J**, **Enwere G**, **Bennett S**, **Kwiatkowski D**, **Greenwood B**. The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. *J Infect Dis* 174: 1091–1097, 1996.

416. **Das BK**, **Mishra S**, **Padhi PK**, **Manish R**, **Tripathy R**, **Sahoo PK**, **Ravindran B**. Pentoxifylline adjunct improves prognosis of human cerebral malaria in adults. *Trop Med Int Health* 8: 680–684, 2003.

417. **Di Perri G**, **Di Perri IG**, **Monteiro GB**, **Bonora S**, **Hennig C**, **Cassatella M**, **Micciolo R**, **Vento S**, **Dusi S**, **Bassetti D**. Pentoxifylline as a supportive agent in the treatment of cerebral malaria in children. *J Infect Dis* 171: 1317–1322, 1995.

418. **Hemmer CJ**, **Hort G**, **Chiwakata CB**, **Seitz R**, **Egbring R**, **Gaus W**, **Hogel J**, **Hassemer M**, **Nawroth PP**, **Kern P**, **Dietrich M**. Supportive pentoxifylline in falciparum malaria: no effect on tumor necrosis factor alpha levels or clinical outcome: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Am J Trop Med Hyg* 56: 397–403, 1997.

419. **Lell B**, **Köhler C**, **Wamola B**, **Olola CH**, **Kivaya E**, **Kokwaro G**, **Wypij D**, **Mithwani S**, **Taylor TE**, **Kremsner PG**, **Newton CRJC**. Pentoxifylline as an adjunct therapy in children with cerebral malaria. *Malar J* 9: 368, 2010.

420. **Looareesuwan S**, **Wilairatana P**, **Vannaphan S**, **Wanaratana V**, **Wenisch C**, **Aikawa M**, **Brittenham G**, **Graninger W**, **Wernsdorfer WH**. Pentoxifylline as an ancillary treatment for severe falciparum malaria in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 58: 348–353, 1998.

421. **Nie CQ**, **Bernard NJ**, **Norman MU**, **Amante FH**, **Lundie RJ**, **Crabb BS**, **Heath WR**, **Engwerda CR**, **Hickey MJ**, **Schofield L**, **Hansen DS**. IP-10-mediated T cell homing promotes cerebral inflammation over splenic immunity to malaria infection. *PLoS Pathog* 5: e1000369, 2009.

422. **Wilson NO**, **Solomon W**, **Anderson L**, **Patrickson J**, **Pitts S**, **Bond V**, **Liu M**, **Stiles JK**. Pharmacologic Inhibition of CXCL10 in Combination with Anti-malarial Therapy Eliminates Mortality Associated with Murine Model of Cerebral Malaria. *PLoS One* 8, 2013.

423. **Ioannidis LJ**, **Nie CQ**, **Hansen DS**. The role of chemokines in severe malaria: more than meets the eye. *Parasitology* 141: 602–613, 2014.

424. **Su Z**, **Tam M-F**, **Jankovic D**, **Stevenson MM**. Vaccination with novel immunostimulatory adjuvants against blood-stage malaria in mice. *Infect Immun* 71: 5178–5187, 2003.

425. **Near KA**, **Stowers AW**, **Jankovic D**, **Kaslow DC**. Improved immunogenicity and efficacy of the recombinant 19-kilodalton merozoite surface protein 1 by the addition of oligodeoxynucleotide and aluminum hydroxide gel in a murine malaria vaccine model. *Infect Immun* 70: 692–701, 2002.

426. **Davis AE**. Biological effects of C1 inhibitor. *Drug News Perspect* 17: 439–446, 2004.

427. **Mejia P**, **Diez-Silva M**, **Kamena F**, **Lu F**, **Fernandes SM**, **Seeberger PH**, **Davis AE**, **Mitchell JR**. Human C1-Inhibitor Suppresses Malaria Parasite Invasion and Cytoadhesion via Binding to Parasite Glycosylphosphatidylinositol and Host Cell Receptors. *J Infect Dis* 213: 80–89, 2016.

428. **Hodgson SH**, **Angus BJ**. Malaria: fluid therapy in severe disease. *BMJ Clin Evid* 2016, 2016.

429. **Casals-Pascual C**, **Idro R**, **Gicheru N**, **Gwer S**, **Kitsao B**, **Gitau E**, **Mwakesi R**, **Roberts DJ**, **Newton CRJC**. High levels of erythropoietin are associated with protection against neurological sequelae in African children with cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2634–2639, 2008.

430. **Picot S**, **Bienvenu A-L**, **Konate S**, **Sissoko S**, **Barry A**, **Diarra E**, **Bamba K**, **Djimdé A**, **Doumbo OK**. Safety of epoietin beta-quinine drug combination in children with cerebral malaria in Mali. *Malar J* 8: 169, 2009.

431. **Mohanty S**, **Benjamin LA**, **Majhi M**, **Panda P**, **Kampondeni S**, **Sahu PK**, **Mohanty A**, **Mahanta KC**, **Pattnaik R**, **Mohanty RR**, **Joshi S**, **Mohanty A**, **Turnbull IW**, **Dondorp AM**, **Taylor TE**, **Wassmer SC**. Magnetic Resonance Imaging of Cerebral Malaria Patients Reveals Distinct Pathogenetic Processes in Different Parts of the Brain. *mSphere* 2, 2017.

432. **Seydel KB**, **Kampondeni SD**, **Valim C**, **Potchen MJ**, **Milner DA**, **Muwalo FW**, **Birbeck GL**, **Bradley WG**, **Fox LL**, **Glover SJ**, **Hammond CA**, **Heyderman RS**, **Chilingulo CA**, **Molyneux ME**, **Taylor TE**. Brain swelling and death in children with cerebral malaria. *N Engl J Med* 372: 1126–1137, 2015.

433. **Mohanty S**, **Mishra SK**, **Patnaik R**, **Dutt AK**, **Pradhan S**, **Das B**, **Patnaik J**, **Mohanty AK**, **Lee SJ**, **Dondorp AM**. Brain swelling and mannitol therapy in adult cerebral malaria: a randomized trial. *Clin Infect Dis* 53: 349–355, 2011.

434. **Namutangula B**, **Ndeezi G**, **Byarugaba JS**, **Tumwine JK**. Mannitol as adjunct therapy for childhood cerebral malaria in Uganda: a randomized clinical trial. *Malar J* 6: 138, 2007.

435. **Newton CR**, **Crawley J**, **Sowumni A**, **Waruiru C**, **Mwangi I**, **English M**, **Murphy S**, **Winstanley PA**, **Marsh K**, **Kirkham FJ**. Intracranial hypertension in Africans with cerebral malaria. *Arch Dis Child* 76: 219–226, 1997.

436. **Rogerson SJ**, **Reeder JC**, **al-Yaman F**, **Brown GV**. Sulfated glycoconjugates as disrupters of Plasmodium falciparum erythrocyte rosettes. *Am J Trop Med Hyg* 51: 198–203, 1994.

437. **Hemmer CJ**, **Kern P**, **Holst FG**, **Nawroth PP**, **Dietrich M**. Neither heparin nor acetylsalicylic acid influence the clinical course in human Plasmodium falciparum malaria: a prospective randomized study. *Am J Trop Med Hyg* 45: 608–612, 1991.

438. **Leitgeb AM**, **Charunwatthana P**, **Rueangveerayut R**, **Uthaisin C**, **Silamut K**, **Chotivanich K**, **Sila P**, **Moll K**, **Lee SJ**, **Lindgren M**, **Holmer E**, **Färnert A**, **Kiwuwa MS**, **Kristensen J**, **Herder C**, **Tarning J**, **Wahlgren M**, **Dondorp AM**. Inhibition of merozoite invasion and transient de-sequestration by sevuparin in humans with Plasmodium falciparum malaria. *PLoS One* 12: e0188754, 2017.

439. **Cirillo F**, **Margaglione M**, **Vecchione G**, **Ames PR**, **Coppola A**, **Grandone E**, **Cerbone AM**, **Marelli C**, **Di Minno G**. In vitro inhibition by defibrotide of monocyte superoxide anion generation: a possible mechanism for the antithrombotic effect of a polydeoxyribonucleotide-derived drug. *Haemostasis* 21: 98–105, 1991.

440. **Francischetti IMB**, **Oliveira CJ**, **Ostera GR**, **Yager SB**, **Debierre-Grockiego F**, **Carregaro V**, **Jaramillo-Gutierrez G**, **Hume JCC**, **Jiang L**, **Moretz SE**, **Lin CK**, **Ribeiro JMC**, **Long CA**, **Vickers BK**, **Schwarz RT**, **Seydel KB**, **Iacobelli M**, **Ackerman HC**, **Srinivasan P**, **Gomes RB**, **Wang X**, **Monteiro RQ**, **Kotsyfakis M**, **Sá-Nunes A**, **Waisberg M**. Defibrotide interferes with several steps of the coagulation-inflammation cycle and exhibits therapeutic potential to treat severe malaria. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 786–798, 2012.

441. **Dondorp AM**, **Silamut K**, **Charunwatthana P**, **Chuasuwanchai S**, **Ruangveerayut R**, **Krintratun S**, **White NJ**, **Ho M**, **Day NPJ**. Levamisole inhibits sequestration of infected red blood cells in patients with falciparum malaria. *J Infect Dis* 196: 460–466, 2007.

442. **Maude RJ**, **Silamut K**, **Plewes K**, **Charunwatthana P**, **Ho M**, **Abul Faiz M**, **Rahman R**, **Hossain MA**, **Hassan MU**, **Bin Yunus E**, **Hoque G**, **Islam F**, **Ghose A**, **Hanson J**, **Schlatter J**, **Lacey R**, **Eastaugh A**, **Tarning J**, **Lee SJ**, **White NJ**, **Chotivanich K**, **Day NPJ**, **Dondorp AM**. Randomized Controlled Trial of Levamisole Hydrochloride as Adjunctive Therapy in Severe Falciparum Malaria With High Parasitemia. *J Infect Dis* 209: 120–129, 2014.

443. **Nik Kamarudin NAA**, **Mohammed NA**, **Mustaffa KMF**. Aptamer Technology: Adjunct Therapy for Malaria. *Biomedicines* 5, 2017.

444. **Dondorp AM**, **Omodeo-Salè F**, **Chotivanich K**, **Taramelli D**, **White NJ**. Oxidative stress and rheology in severe malaria. *Redox Rep* 8: 292–294, 2003.

445. **Smith HJ**, **Meremikwu M**. Iron chelating agents for treating malaria. *Cochrane Database Syst Rev* : CD001474, 2003.

446. **Cotgreave IA**. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* 38: 205–227, 1997.

447. **Ackerman HC**, **Beaudry SD**, **Fairhurst RM**. Antioxidant therapy: Reducing malaria severity? *Crit Care Med* 37: 758–760, 2009.

448. **Charunwatthana P**, **Abul Faiz M**, **Ruangveerayut R**, **Maude RJ**, **Rahman MR**, **Roberts LJ**, **Moore K**, **Bin Yunus E**, **Hoque MG**, **Hasan MU**, **Lee SJ**, **Pukrittayakamee S**, **Newton PN**, **White NJ**, **Day NPJ**, **Dondorp AM**. N-acetylcysteine as adjunctive treatment in severe malaria: a randomized, double-blinded placebo-controlled clinical trial. *Crit Care Med* 37: 516–522, 2009.

449. **Treeprasertsuk S**, **Krudsood S**, **Tosukhowong T**, **Maek-A-Nantawat W**, **Vannaphan S**, **Saengnetswang T**, **Looareesuwan S**, **Kuhn WF**, **Brittenham G**, **Carroll J**. N-acetylcysteine in severe falciparum malaria in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34: 37–42, 2003.

450. **Pulido-Moran M**, **Moreno-Fernandez J**, **Ramirez-Tortosa C**, **Ramirez-Tortosa M**. Curcumin and Health. *Molecules* 21: 264, 2016.

451. **Dende C**, **Meena J**, **Nagarajan P**, **Panda AK**, **Rangarajan PN**, **Padmanaban G**. Simultaneously targeting inflammatory response and parasite sequestration in brain to treat Experimental Cerebral Malaria. *Scientific Reports* 5: 12671, 2015.

452. **Jain K**, **Sood S**, **Gowthamarajan K**. Modulation of cerebral malaria by curcumin as an adjunctive therapy. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 17: 579–591, 2013.

453. **Reddy RC**, **Vatsala PG**, **Keshamouni VG**, **Padmanaban G**, **Rangarajan PN**. Curcumin for malaria therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 472–474, 2005.

454. **Rashidzadeh H**, **Salimi M**, **Sadighian S**, **Rostamizadeh K**, **Ramazani A**. In vivo Antiplasmodial Activity of Curcumin-Loaded Nanostructured Lipid Carriers. *Curr Drug Deliv* 16: 923–930, 2019.

455. **Hawkes MT**, **Conroy AL**, **Opoka RO**, **Hermann L**, **Thorpe KE**, **McDonald C**, **Kim H**, **Higgins S**, **Namasopo S**, **John C**, **Miller C**, **Liles WC**, **Kain KC**. Inhaled nitric oxide as adjunctive therapy for severe malaria: a randomized controlled trial. *Malar J* 14: 421, 2015. doi: 10.1186/s12936-015-0946-2.

456. **Mwanga-Amumpaire J**, **Carroll RW**, **Baudin E**, **Kemigisha E**, **Nampijja D**, **Mworozi K**, **Santorino D**, **Nyehangane D**, **Nathan DI**, **De Beaudrap P**, **Etard J-F**, **Feelisch M**, **Fernandez BO**, **Berssenbrugge A**, **Bangsberg D**, **Bloch KD**, **Boum Y**, **Zapol WM**. Inhaled Nitric Oxide as an Adjunctive Treatment for Cerebral Malaria in Children: A Phase II Randomized Open-Label Clinical Trial. *Open Forum Infect Dis* 2: ofv111, 2015.

457. **Bangirana P**, **Conroy AL**, **Opoka RO**, **Hawkes MT**, **Hermann L**, **Miller C**, **Namasopo S**, **Liles WC**, **John CC**, **Kain KC**. Inhaled nitric oxide and cognition in pediatric severe malaria: A randomized double-blind placebo controlled trial. *PLoS One* 13: e0191550, 2018.

458. **Royo J**, **Rahabi M**, **Kamaliddin C**, **Ezinmegnon S**, **Olagnier D**, **Authier H**, **Massougbodji A**, **Alao J**, **Ladipo Y**, **Deloron P**, **Bertin G**, **Pipy B**, **Coste A**, **Aubouy A**. Changes in monocyte subsets are associated with clinical outcomes in severe malarial anaemia and cerebral malaria. *Scientific Reports* 9: 17545, 2019.

459. **Gnanguenon V**, **Govoetchan R**, **Agossa FR**, **Ossè R**, **Oke-Agbo F**, **Azondekon R**, **Sovi A**, **Attolou R**, **Badirou K**, **Tokponnon FT**, **Padonou GG**, **Akogbeto MC**. Transmission patterns of Plasmodium falciparum by Anopheles gambiae in Benin. *Malar J* 13: 444, 2014.

460. **Wang S-J**, **Lengeler C**, **Smith TA**, **Vounatsou P**, **Akogbeto M**, **Tanner M**. Rapid Urban Malaria Appraisal (RUMA) IV: epidemiology of urban malaria in Cotonou (Benin). *Malar J* 5: 45, 2006.

461. **Doritchamou JYA**, **Akuffo RA**, **Moussiliou A**, **Luty AJF**, **Massougbodji A**, **Deloron P**, **Tuikue Ndam NG**. Submicroscopic placental infection by non-falciparum Plasmodium spp. *PLoS Negl Trop Dis* 12: e0006279, 2018.

462. **Ministère de la santé du Bénin**. Ministère de la santé du Bénin [Online]. [date unknown]. https://sante.gouv.bj/.

463. **Yui K**. Cross-presentation of malaria antigen by brain microvessels: why CD8+ T cells are critical for the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *EMBO Mol Med* 5: 899–901, 2013.

464. **Riggle BA**, **Manglani M**, **Maric D**, **Johnson KR**, **Lee M-H**, **Neto OLA**, **Taylor TE**, **Seydel KB**, **Nath A**, **Miller LH**, **McGavern DB**, **Pierce SK**. CD8+ T cells target cerebrovasculature in children with cerebral malaria. *J Clin Invest* 130: 1128–1138, 2020.

465. **Safeukui I**, **Gomez ND**, **Adelani AA**, **Burte F**, **Afolabi NK**, **Akondy R**, **Velazquez P**, **Holder A**, **Tewari R**, **Buffet P**, **Brown BJ**, **Shokunbi WA**, **Olaleye D**, **Sodeinde O**, **Kazura J**, **Ahmed R**, **Mohandas N**, **Fernandez-Reyes D**, **Haldar K**. Malaria induces anemia through CD8+ T cell-dependent parasite clearance and erythrocyte removal in the spleen. *mBio* 6, 2015.

466. **Hviid L**, **Kurtzhals JA**, **Goka BQ**, **Oliver-Commey JO**, **Nkrumah FK**, **Theander TG**. Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Infect Immun* 65: 4090–4093, 1997.

467. **Palomo J**, **Reverchon F**, **Piotet J**, **Besnard A-G**, **Couturier-Maillard A**, **Maillet I**, **Tefit M**, **Erard F**, **Mazier D**, **Ryffel B**, **Quesniaux VFJ**. Critical role of IL-33 receptor ST2 in experimental cerebral malaria development. *Eur J Immunol* 45: 1354–1365, 2015.

468. **Savill J**. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* 61: 375–380, 1997.

469. **Serhan CN**, **Savill J**. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6: 1191–1197, 2005.

470. **Hunt NH**, **Grau GE**. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol* 24: 491–499, 2003.

471. **Boivin MJ**, **Gladstone MJ**, **Vokhiwa M**, **Birbeck GL**, **Magen JG**, **Page C**, **Semrud-Clikeman M**, **Kauye F**, **Taylor TE**. Developmental outcomes in Malawian children with retinopathy-positive cerebral malaria. *Trop Med Int Health* 16: 263–271, 2011.

472. **Beare NAV**, **Lewallen S**, **Taylor TE**, **Molyneux ME**. Redefining cerebral malaria by including malaria retinopathy. *Future Microbiol* 6: 349–355, 2011.

473. **Maude RJ**, **Dondorp AM**, **Abu Sayeed A**, **Day NPJ**, **White NJ**, **Beare NAV**. The eye in cerebral malaria: what can it teach us? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103: 661–664, 2009.

474. **White VA**, **Lewallen S**, **Beare N**, **Kayira K**, **Carr RA**, **Taylor TE**. Correlation of retinal haemorrhages with brain haemorrhages in children dying of cerebral malaria in Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 618–621, 2001.

475. **Craig AG**, **Grau GE**, **Janse C**, **Kazura JW**, **Milner D**, **Barnwell JW**, **Turner G**, **Langhorne J**, **participants of the Hinxton Retreat meeting on Animal Models for Research on Severe Malaria**. The role of animal models for research on severe malaria. *PLoS Pathog* 8: e1002401, 2012.

476. **de Souza JB**, **Riley EM**. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect* 4: 291–300, 2002.

477. **de Souza JB**, **Hafalla JCR**, **Riley EM**, **Couper KN**. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* 137: 755–772, 2010.

478. **Ghazanfari N**, **Mueller SN**, **Heath WR**. Cerebral Malaria in Mouse and Man. *Front Immunol* 9: 2016, 2018.

479. **Strangward P**, **Haley MJ**, **Shaw TN**, **Schwartz J-M**, **Greig R**, **Mironov A**, **de Souza JB**, **Cruickshank SM**, **Craig AG**, **Milner DA**, **Allan SM**, **Couper KN**. A quantitative brain map of experimental cerebral malaria pathology. *PLoS Pathog* 13: e1006267, 2017.

480. **Hearn J**, **Rayment N**, **Landon DN**, **Katz DR**, **de Souza JB**. Immunopathology of cerebral malaria: morphological evidence of parasite sequestration in murine brain microvasculature. *Infect Immun* 68: 5364–5376, 2000.

481. **Belnoue E**, **Kayibanda M**, **Vigario AM**, **Deschemin J-C**, **van Rooijen N**, **Viguier M**, **Snounou G**, **Rénia L**. On the pathogenic role of brain-sequestered alphabeta CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *J Immunol* 169: 6369–6375, 2002.

482. **Hansen DS**, **Bernard NJ**, **Nie CQ**, **Schofield L**. NK Cells Stimulate Recruitment of CXCR3+ T Cells to the Brain during Plasmodium berghei-Mediated Cerebral Malaria. *The Journal of Immunology* 178: 5779–5788, 2007.

483. **White NJ**, **Turner GDH**, **Medana IM**, **Dondorp AM**, **Day NPJ**. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol* 26: 11–15, 2010.

484. **Baptista FG**, **Pamplona A**, **Pena AC**, **Mota MM**, **Pied S**, **Vigário AM**. Accumulation of Plasmodium berghei-Infected Red Blood Cells in the Brain Is Crucial for the Development of Cerebral Malaria in Mice. *Infect Immun* 78: 4033–4039, 2010.

485. **Nitcheu J**, **Bonduelle O**, **Combadiere C**, **Tefit M**, **Seilhean D**, **Mazier D**, **Combadiere B**. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8+ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. *J Immunol* 170: 2221–2228, 2003.

486. **Barrera V**, **Haley MJ**, **Strangward P**, **Attree E**, **Kamiza S**, **Seydel KB**, **Taylor TE**, **Milner DA**, **Craig AG**, **Couper KN**. Comparison of CD8+ T Cell Accumulation in the Brain During Human and Murine Cerebral Malaria. *Front Immunol* 10, 2019.

487. **Zak DE**, **Aderem A**. Systems integration of innate and adaptive immunity. *Vaccine* 33: 5241–5248, 2015.

488. **Richard SA**, **Kampo S**, **Hechavarria ME**, **Sackey M**, **Buunaaim ADB**, **Kuugbee ED**, **Anabah TW**. Elucidating the Pivotal Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Potentials of Chloroquine and Hydroxychloroquine. *J Immunol Res* 2020: 4582612, 2020.

489. **Zhang C**, **He Y**, **Okutsu M**, **Ong LC**, **Jin Y**, **Zheng L**, **Chow P**, **Yu S**, **Zhang M**, **Yan Z**. Autophagy is involved in adipogenic differentiation by repressesing proteasome-dependent PPARγ2 degradation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305: E530-539, 2013.

490. **Ben-Zvi I**, **Kivity S**, **Langevitz P**, **Shoenfeld Y**. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 42: 145–153, 2012.

491. **Schaer CA**, **Laczko E**, **Schoedon G**, **Schaer DJ**, **Vallelian F**. Chloroquine interference with hemoglobin endocytic trafficking suppresses adaptive heme and iron homeostasis in macrophages: the paradox of an antimalarial agent. *Oxid Med Cell Longev* 2013: 870472, 2013.

492. **Schultz KR**, **Nelson D**, **Bader S**. Synergy between lysosomotropic amines and cyclosporin A on human T cell responses to an exogenous protein antigen, tetanus toxoid. *Bone Marrow Transplant* 18: 625–631, 1996.

493. **Zhu X**, **Pan Y**, **Li Y**, **Jiang Y**, **Shang H**, **Gowda DC**, **Cui L**, **Cao Y**. Targeting Toll-like receptors by chloroquine protects mice from experimental cerebral malaria. *Int Immunopharmacol* 13: 392–397, 2012.

494. **Hong Z**, **Jiang Z**, **Liangxi W**, **Guofu D**, **Ping L**, **Yongling L**, **Wendong P**, **Minghai W**. Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release. *Int Immunopharmacol* 4: 223–234, 2004.

495. **Hugosson E**, **Björkman A**, **Troye-Blomberg M**. Chloroquine enhances the number of IL-10 producing cells and the expression of B7-2 and ICAM-1 in in vitro-cultured PBMC. *Scand J Immunol* 55: 399–408, 2002.

496. **Weber SM**, **Levitz SM**. Chloroquine interferes with lipopolysaccharide-induced TNF-alpha gene expression by a nonlysosomotropic mechanism. *J Immunol* 165: 1534–1540, 2000.

497. **Zuo R**, **Wang Y**, **Li J**, **Wu J**, **Wang W**, **Li B**, **Sun C**, **Wang Z**, **Shi C**, **Zhou Y**, **Liu M**, **Zhang C**. Rapamycin Induced Autophagy Inhibits Inflammation-Mediated Endplate Degeneration by Enhancing Nrf2/Keap1 Signaling of Cartilage Endplate Stem Cells. *Stem Cells* 37: 828–840, 2019.

498. **Carroll RW**, **Wainwright MS**, **Kim K-Y**, **Kidambi T**, **Gómez ND**, **Taylor T**, **Haldar K**. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS ONE* 5, 2010.

499. **Comim CM**, **Reis PA**, **Frutuoso VS**, **Fries GR**, **Fraga DB**, **Kapczinski F**, **Zugno AI**, **Barichello T**, **Quevedo J**, **Castro-Faria-Neto HC**. Effects of experimental cerebral malaria in memory, brain-derived neurotrophic factor and acetylcholinesterase activity [correction for acitivity] in the hippocampus of survivor mice. *Neurosci Lett* 523: 104–107, 2012.

500. **Dai M**, **Reznik SE**, **Spray DC**, **Weiss LM**, **Tanowitz HB**, **Gulinello M**, **Desruisseaux MS**. Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microbes Infect* 12: 1198–1207, 2010.

501. **de Sousa LP**, **de Almeida RF**, **Ribeiro-Gomes FL**, **de Moura Carvalho LJ**, **E Souza TM**, **de Souza DOG**, **Daniel-Ribeiro CT**. Long-term effect of uncomplicated Plasmodium berghei ANKA malaria on memory and anxiety-like behaviour in C57BL/6 mice. *Parasit Vectors* 11: 191, 2018.

502. **Promeneur D**, **Lunde LK**, **Amiry-Moghaddam M**, **Agre P**. Protective role of brain water channel AQP4 in murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1035–1040, 2013.

503. **Reis PA**, **Comim CM**, **Hermani F**, **Silva B**, **Barichello T**, **Portella AC**, **Gomes FCA**, **Sab IM**, **Frutuoso VS**, **Oliveira MF**, **Bozza PT**, **Bozza FA**, **Dal-Pizzol F**, **Zimmerman GA**, **Quevedo J**, **Castro-Faria-Neto HC**. Cognitive Dysfunction Is Sustained after Rescue Therapy in Experimental Cerebral Malaria, and Is Reduced by Additive Antioxidant Therapy. *PLoS Pathog* 6, 2010.

504. **Waknine-Grinberg JH**, **Hunt N**, **Bentura-Marciano A**, **McQuillan JA**, **Chan H-W**, **Chan W-C**, **Barenholz Y**, **Haynes RK**, **Golenser J**. Artemisone effective against murine cerebral malaria. *Malar J* 9: 227, 2010.

505. **Fang L**, **Zhang M**, **Li Y**, **Liu Y**, **Cui Q**, **Wang N**. PPARgene: A Database of Experimentally Verified and Computationally Predicted PPAR Target Genes. *PPAR Res* 2016: 6042162, 2016.

506. **Lacher SE**, **Levings DC**, **Freeman S**, **Slattery M**. Identification of a functional antioxidant response element at the HIF1A locus. *Redox Biol* 19: 401–411, 2018.

507. **Nioi P**, **McMahon M**, **Itoh K**, **Yamamoto M**, **Hayes JD**. Identification of a novel Nrf2-regulated antioxidant response element (ARE) in the mouse NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene: reassessment of the ARE consensus sequence. *Biochem J* 374: 337–348, 2003.

508. **Reichard JF**, **Motz GT**, **Puga A**. Heme oxygenase-1 induction by NRF2 requires inactivation of the transcriptional repressor BACH1. *Nucleic Acids Res* 35: 7074–7086, 2007.

509. **Collins RF**, **Touret N**, **Kuwata H**, **Tandon NN**, **Grinstein S**, **Trimble WS**. Uptake of oxidized low density lipoprotein by CD36 occurs by an actin-dependent pathway distinct from macropinocytosis. *J Biol Chem* 284: 30288–30297, 2009.

510. **Villar-Vesga J**, **Grajales C**, **Burbano C**, **Vanegas-García A**, **Muñoz-Vahos CH**, **Vásquez G**, **Rojas M**, **Castaño D**. Platelet-derived microparticles generated in vitro resemble circulating vesicles of patients with rheumatoid arthritis and activate monocytes. *Cell Immunol* 336: 1–11, 2019.

511. **Liu B**, **Deng X**, **Jiang Q**, **Li G**, **Zhang J**, **Zhang N**, **Xin S**, **Xu K**. Scoparone improves hepatic inflammation and autophagy in mice with nonalcoholic steatohepatitis by regulating the ROS/P38/Nrf2 axis and PI3K/AKT/mTOR pathway in macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 125: 109895, 2020.

512. **Shen H**, **Wu N**, **Wang Y**, **Zhao H**, **Zhang L**, **Li T**, **Zhao M**. Chloroquine attenuates paraquat-induced lung injury in mice by altering inflammation, oxidative stress and fibrosis. *Int Immunopharmacol* 46: 16–22, 2017.

513. **Aitman TJ**, **Cooper LD**, **Norsworthy PJ**, **Wahid FN**, **Gray JK**, **Curtis BR**, **McKeigue PM**, **Kwiatkowski D**, **Greenwood BM**, **Snow RW**, **Hill AV**, **Scott J**. Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature* 405: 1015–1016, 2000.

514. **Van Gorp H**, **Delputte PL**, **Nauwynck HJ**. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* 47: 1650–1660, 2010.

515. **Tippett E**, **Cheng W-J**, **Westhorpe C**, **Cameron PU**, **Brew BJ**, **Lewin SR**, **Jaworowski A**, **Crowe SM**. Differential expression of CD163 on monocyte subsets in healthy and HIV-1 infected individuals. *PLoS One* 6: e19968, 2011.

516. **Chua CLL**, **Brown GV**, **Hamilton JA**, **Molyneux ME**, **Rogerson SJ**, **Boeuf P**. Soluble CD163, a product of monocyte/macrophage activation, is inversely associated with haemoglobin levels in placental malaria. *PLoS One* 8: e64127, 2013.

517. **Otterdal K**, **Berg A**, **Michelsen AE**, **Patel S**, **Tellevik MG**, **Haanshuus CG**, **Fevang B**, **Aukrust P**, **Langeland N**, **Ueland T**. Soluble markers of neutrophil, T-cell and monocyte activation are associated with disease severity and parasitemia in falciparum malaria. *BMC Infectious Diseases* 18: 670, 2018.

518. **Sen A**, **Chowdhury IH**, **Mukhopadhyay D**, **Paine SK**, **Mukherjee A**, **Mondal LK**, **Chatterjee M**, **Bhattacharya B**. Increased Toll-like receptor-2 expression on nonclassic CD16+ monocytes from patients with inflammatory stage of Eales' disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 6940–6948, 2011.

519. **James KR**, **Soon MSF**, **Sebina I**, **Fernandez-Ruiz D**, **Davey G**, **Liligeto UN**, **Nair AS**, **Fogg LG**, **Edwards CL**, **Best SE**, **Lansink LIM**, **Schroder K**, **Wilson JAC**, **Austin R**, **Suhrbier A**, **Lane SW**, **Hill GR**, **Engwerda CR**, **Heath WR**, **Haque A**. IFN Regulatory Factor 3 Balances Th1 and T Follicular Helper Immunity during Nonlethal Blood-Stage Plasmodium Infection. *J Immunol* 200: 1443–1456, 2018.

520. **Mandala WL**, **Msefula CL**, **Gondwe EN**, **Drayson MT**, **Molyneux ME**, **MacLennan CA**. Monocyte activation and cytokine production in Malawian children presenting with P. falciparum malaria. *Parasite Immunol* 38: 317–325, 2016.

521. **Urban BC**, **Cordery D**, **Shafi MJ**, **Bull PC**, **Newbold CI**, **Williams TN**, **Marsh K**. The frequency of BDCA3-positive dendritic cells is increased in the peripheral circulation of Kenyan children with severe malaria. *Infect Immun* 74: 6700–6706, 2006.

522. **Singh NK**, **Rao GN**. Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. *Prog Lipid Res* 73: 28–45, 2019.

523. **Thongchot S**, **Loilome W**, **Yongvanit P**, **Dokduang H**, **Thanan R**, **Techasen A**, **Namwat N**. Chloroquine exerts anti-metastatic activities under hypoxic conditions in cholangiocarcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 16: 2031–2035, 2015.

524. **Medana IM**, **Day NPJ**, **Roberts R**, **Sachanonta N**, **Turley H**, **Pongponratn E**, **Hien TT**, **White NJ**, **Turner GDH**. Induction of the vascular endothelial growth factor pathway in the brain of adults with fatal falciparum malaria is a non-specific response to severe disease. *Histopathology* 57: 282–294, 2010.

525. **Ball HJ**, **MacDougall HG**, **McGregor IS**, **Hunt NH**. Cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Infect Dis* 189: 751–758, 2004.

526. **Xiao L**, **Patterson PS**, **Yang C**, **Lal AA**. Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg* 60: 668–673, 1999.

527. **Borges TKS**, **Alves ÉAR**, **Vasconcelos HAR**, **Carneiro FP**, **Nicola AM**, **Magalhães KG**, **Muniz-Junqueira MI**. Differences in the modulation of reactive species, lipid bodies, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and PPAR-γ in cerebral malaria-susceptible and resistant mice. *Immunobiology* 222: 604–619, 2017.

528. **Okorji UP**, **Olajide OA**. A semi-synthetic derivative of artemisinin, artesunate inhibits prostaglandin E2 production in LPS/IFNγ-activated BV2 microglia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22: 4726–4734, 2014.

529. **Zhang P**, **Luo H-S**, **Li M**, **Tan S-Y**. Artesunate inhibits the growth and induces apoptosis of human gastric cancer cells by downregulating COX-2. *Onco Targets Ther* 8: 845–854, 2015.

530. **Anyona SB**, **Kempaiah P**, **Raballah E**, **Davenport GC**, **Were T**, **Konah SN**, **Vulule JM**, **Hittner JB**, **Gichuki CW**, **Ong'echa JM**, **Perkins DJ**. 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. *Am J Hematol* 87: 782–789, 2012.

531. **Keller CC**, **Davenport GC**, **Dickman KR**, **Hittner JB**, **Kaplan SS**, **Weinberg JB**, **Kremsner PG**, **Perkins DJ**. Suppression of prostaglandin E2 by malaria parasite products and antipyretics promotes overproduction of tumor necrosis factor-alpha: association with the pathogenesis of childhood malarial anemia. *J Infect Dis* 193: 1384–1393, 2006. doi: 10.1086/503047.

532. **Keller CC**, **Hittner JB**, **Nti BK**, **Weinberg JB**, **Kremsner PG**, **Perkins DJ**. Reduced peripheral PGE2 biosynthesis in Plasmodium falciparum malaria occurs through hemozoin-induced suppression of blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 gene expression via an interleukin-10-independent mechanism. *Mol Med* 10: 45–54, 2004.

533. **Perkins DJ**, **Hittner JB**, **Mwaikambo ED**, **Granger DL**, **Weinberg JB**, **Anstey NM**. Impaired systemic production of prostaglandin E2 in children with cerebral malaria. *J Infect Dis* 191: 1548–1557, 2005.

534. **Perkins DJ**, **Kremsner PG**, **Weinberg JB**. Inverse relationship of plasma prostaglandin E2 and blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 with disease severity in children with Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* 183: 113–118, 2001.

535. **Sarr D**, **Aldebert D**, **Marrama L**, **Frealle E**, **Gaye A**, **Brahim HO**, **Niang M**, **Dangou JM**, **Mercereau-Puijalon O**, **Lehesran JY**, **Jambou R**. Chronic infection during placental malaria is associated with up-regulation of cycloxygenase-2. *Malar J* 9: 45, 2010.

536. **Deininger MH**, **Kremsner PG**, **Meyermann R**, **Schluesener HJ**. Focal accumulation of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 expressing cells in cerebral malaria. *Journal of Neuroimmunology* 106: 198–205, 2000.

537. **Ackermann JA**, **Hofheinz K**, **Zaiss MM**, **Krönke G**. The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862: 371–381, 2017.

538. **Bolick DT**, **Orr AW**, **Whetzel A**, **Srinivasan S**, **Hatley ME**, **Schwartz MA**, **Hedrick CC**. 12/15-lipoxygenase regulates intercellular adhesion molecule-1 expression and monocyte adhesion to endothelium through activation of RhoA and nuclear factor-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2301–2307, 2005.

539. **Kayama Y**, **Minamino T**, **Toko H**, **Sakamoto M**, **Shimizu I**, **Takahashi H**, **Okada S**, **Tateno K**, **Moriya J**, **Yokoyama M**, **Nojima A**, **Yoshimura M**, **Egashira K**, **Aburatani H**, **Komuro I**. Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. *J Exp Med* 206: 1565–1574, 2009.

540. **Namgaladze D**, **Snodgrass RG**, **Angioni C**, **Grossmann N**, **Dehne N**, **Geisslinger G**, **Brüne B**. AMP-activated protein kinase suppresses arachidonate 15-lipoxygenase expression in interleukin 4-polarized human macrophages. *J Biol Chem* 290: 24484–24494, 2015.

541. **Sun L**, **Xu Y-W**, **Han J**, **Liang H**, **Wang N**, **Cheng Y**. 12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPARγ: a possible neuroprotective effect in ischemic brain. *J Lipid Res* 56: 502–514, 2015.

542. **Uderhardt S**, **Herrmann M**, **Oskolkova OV**, **Aschermann S**, **Bicker W**, **Ipseiz N**, **Sarter K**, **Frey B**, **Rothe T**, **Voll R**, **Nimmerjahn F**, **Bochkov VN**, **Schett G**, **Krönke G**. 12/15-lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance. *Immunity* 36: 834–846, 2012.

543. **Souza MC**, **Pádua TA**, **Torres ND**, **Souza Costa MF**, **Candéa AP**, **Maramaldo T**, **Seito LN**, **Penido C**, **Estato V**, **Antunes B**, **Silva L**, **Pinheiro AA**, **Caruso-Neves C**, **Tibiriçá E**, **Carvalho L**, **Henriques MG**. Lipoxin A4 attenuates endothelial dysfunction during experimental cerebral malaria. *Int Immunopharmacol* 24: 400–407, 2015.

544. **Krönke G**, **Katzenbeisser J**, **Uderhardt S**, **Zaiss MM**, **Scholtysek C**, **Schabbauer G**, **Zarbock A**, **Koenders MI**, **Axmann R**, **Zwerina J**, **Baenckler HW**, **van den Berg W**, **Voll RE**, **Kühn H**, **Joosten LAB**, **Schett G**. 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. *J Immunol* 183: 3383–3389, 2009.

545. **Frigerio F**, **Pasqualini G**, **Craparotta I**, **Marchini S**, **van Vliet EA**, **Foerch P**, **Vandenplas C**, **Leclercq K**, **Aronica E**, **Porcu L**, **Pistorius K**, **Colas RA**, **Hansen TV**, **Perretti M**, **Kaminski RM**, **Dalli J**, **Vezzani A**. n-3 Docosapentaenoic acid-derived protectin D1 promotes resolution of neuroinflammation and arrests epileptogenesis. *Brain* 141: 3130–3143, 2018.

546. **Al-Huseini LMA**, **Aw Yeang HX**, **Sethu S**, **Alhumeed N**, **Hamdam JM**, **Tingle Y**, **Djouhri L**, **Kitteringham N**, **Park BK**, **Goldring CE**, **Sathish JG**. Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2) p45-related factor-2 (Nrf2) modulates dendritic cell immune function through regulation of p38 MAPK-cAMP-responsive element binding protein/activating transcription factor 1 signaling. *J Biol Chem* 288: 22281–22288, 2013.

547. **Mariani M**, **Lang R**, **Binda E**, **Panina-Bordignon P**, **D'Ambrosio D**. Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells. *Eur J Immunol* 34: 231–240, 2004.

548. **Scheu S**, **Ali S**, **Ruland C**, **Arolt V**, **Alferink J**. The C-C Chemokines CCL17 and CCL22 and Their Receptor CCR4 in CNS Autoimmunity. *Int J Mol Sci* 18, 2017.

549. **Alferink J**, **Specht S**, **Arends H**, **Schumak B**, **Schmidt K**, **Ruland C**, **Lundt R**, **Kemter A**, **Dlugos A**, **Kuepper JM**, **Poppensieker K**, **Findeiss M**, **Albayram Ö**, **Otte D-M**, **Marazzi J**, **Gertsch J**, **Förster I**, **Maier W**, **Scheu S**, **Hoerauf A**, **Zimmer A**. Cannabinoid Receptor 2 Modulates Susceptibility to Experimental Cerebral Malaria through a CCL17-dependent Mechanism. *J Biol Chem* 291: 19517–19531, 2016.

550. **Hansen DS**, **Schofield L**. Natural regulatory T cells in malaria: host or parasite allies? *PLoS Pathog* 6: e1000771, 2010.

551. **Kurup SP**, **Obeng-Adjei N**, **Anthony SM**, **Traore B**, **Doumbo OK**, **Butler NS**, **Crompton PD**, **Harty JT**. Regulatory T cells impede acute and long-term immunity to blood-stage malaria through CTLA-4. *Nat Med* 23: 1220–1225, 2017.

552. **Mallewa M**, **Vallely P**, **Faragher B**, **Banda D**, **Klapper P**, **Mukaka M**, **Khofi H**, **Pensulo P**, **Taylor T**, **Molyneux M**, **Solomon T**. Viral CNS infections in children from a malaria-endemic area of Malawi: a prospective cohort study. *Lancet Glob Health* 1: e153-160, 2013.

553. **Beare NAV**, **Taylor TE**, **Harding SP**, **Lewallen S**, **Molyneux ME**. Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 75: 790–797, 2006.

554. **Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers**. Hematocell [Online]. [date unknown]. http://www.hematocell.fr/index.php.

555. **Lesi FE**, **Nwosu SU**, **Mafe AG**, **Egri-Okwaji MT**. Pattern of cerebral malaria in children at the Lagos University Teaching Hospital. *Niger Postgrad Med J* 12: 275–279, 2005.

556. **Camara B**, **Diagne-Gueye NR**, **Faye PM**, **Fall ML**, **Ndiaye JL**, **Ba M**, **Sow HD**. Malaria severity criteria and prognostic factors among children in Dakar. *Med Mal Infect* 41: 63–67, 2011.

557. **Zanoni I**, **Granucci F**. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 2013. doi: 10.3389/fcimb.2013.00032.

558. **Devitt A**, **Moffatt OD**, **Raykundalia C**, **Capra JD**, **Simmons DL**, **Gregory CD**. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392: 505–509, 1998. doi: 10.1038/33169.

559. **Oakley MS**, **McCutchan TF**, **Anantharaman V**, **Ward JM**, **Faucette L**, **Erexson C**, **Mahajan B**, **Zheng H**, **Majam V**, **Aravind L**, **Kumar S**. Host Biomarkers and Biological Pathways That Are Associated with the Expression of Experimental Cerebral Malaria in Mice. *Infect Immun* 76: 4518–4529, 2008.

560. **Potter S**, **Chan-Ling T**, **Ball HJ**, **Mansour H**, **Mitchell A**, **Maluish L**, **Hunt NH**. Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria. *Int J Parasitol* 36: 485–496, 2006.

561. **Oakley MS**, **Majam V**, **Mahajan B**, **Gerald N**, **Anantharaman V**, **Ward JM**, **Faucette LJ**, **McCutchan TF**, **Zheng H**, **Terabe M**, **Berzofsky JA**, **Aravind L**, **Kumar S**. Pathogenic Roles of CD14, Galectin-3, and OX40 during Experimental Cerebral Malaria in Mice. *PLoS One* 4, 2009.

562. **Wenisch C**, **Wenisch H**, **Parschalk B**, **Vanijanonta S**, **Burgmann H**, **EXNER M**, **ZEDWITZ-LIEBENSTEIN K**, **THALHAMMER F**, **GEORGOPOULOS A**, **GRANINGER W**, **LOOAREESUWAN S**. Elevated levels of soluble CD14 in serum of patients with acute Plasmodium falciparum malaria. *Clin Exp Immunol* 105: 74–78, 1996.

563. **Hill AV**, **Allsopp CE**, **Kwiatkowski D**, **Anstey NM**, **Twumasi P**, **Rowe PA**, **Bennett S**, **Brewster D**, **McMichael AJ**, **Greenwood BM**. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* 352: 595–600, 1991.

564. **Landsman L**, **Bar-On L**, **Zernecke A**, **Kim K-W**, **Krauthgamer R**, **Shagdarsuren E**, **Lira SA**, **Weissman IL**, **Weber C**, **Jung S**. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113: 963–972, 2009.

565. **Cunnington AJ**, **Njie M**, **Correa S**, **Takem EN**, **Riley EM**, **Walther M**. Prolonged neutrophil dysfunction after Plasmodium falciparum malaria is related to hemolysis and heme oxygenase-1 induction. *J Immunol* 189: 5336–5346, 2012.

566. **Choudhary R**, **Malairaman U**, **Katyal A**. Inhibition of 12/15 LOX ameliorates cognitive and cholinergic dysfunction in mouse model of hypobaric hypoxia via. attenuation of oxidative/nitrosative stress. *Neuroscience* 359: 308–324, 2017.

567. **Trevelin SC**, **Shah AM**, **Lombardi G**. Beyond bacterial killing: NADPH oxidase 2 is an immunomodulator. *Immunol Lett* 221: 39–48, 2020.

568. **Dunst J**, **Kamena F**, **Matuschewski K**. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 2017.

569. **Olszewski MA**, **Huffnagle GB**, **Traynor TR**, **McDonald RA**, **Cook DN**, **Toews GB**. Regulatory Effects of Macrophage Inflammatory Protein 1α/CCL3 on the Development of Immunity to Cryptococcus neoformans Depend on Expression of Early Inflammatory Cytokines. *Infect Immun* 69: 6256–6263, 2001.

570. **Che JN**, **Nmorsi OPG**, **Nkot BP**, **Isaac C**, **Okonkwo BC**. Chemokines responses to Plasmodium falciparum malaria and co-infections among rural Cameroonians. *Parasitol Int* 64: 139–144, 2015.

571. **Adukpo S**, **Kusi KA**, **Ofori MF**, **Tetteh JKA**, **Amoako-Sakyi D**, **Goka BQ**, **Adjei GO**, **Edoh DA**, **Akanmori BD**, **Gyan BA**, **Dodoo D**. High plasma levels of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 are associated with cerebral malaria. *PLoS One* 8: e84181, 2013.

572. **Carvalho LJ de M**, **Moreira A da S**, **Daniel-Ribeiro CT**, **Martins YC**. Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 577–588, 2014.

573. **Conroy AL**, **Phiri H**, **Hawkes M**, **Glover S**, **Mallewa M**, **Seydel KB**, **Taylor TE**, **Molyneux ME**, **Kain KC**. Endothelium-Based Biomarkers Are Associated with Cerebral Malaria in Malawian Children: A Retrospective Case-Control Study. *PLoS One* 5, 2010.

574. **Erdman LK**, **Dhabangi A**, **Musoke C**, **Conroy AL**, **Hawkes M**, **Higgins S**, **Rajwans N**, **Wolofsky KT**, **Streiner DL**, **Liles WC**, **Cserti-Gazdewich CM**, **Kain KC**. Combinations of host biomarkers predict mortality among Ugandan children with severe malaria: a retrospective case-control study. *PLoS One* 6: e17440, 2011.

575. **Moxon CA**, **Chisala NV**, **Wassmer SC**, **Taylor TE**, **Seydel KB**, **Molyneux ME**, **Faragher B**, **Kennedy N**, **Toh C-H**, **Craig AG**, **Heyderman RS**. Persistent endothelial activation and inflammation after Plasmodium falciparum Infection in Malawian children. *J Infect Dis* 209: 610–615, 2014.

576. **Conroy AL**, **Glover SJ**, **Hawkes M**, **Erdman LK**, **Seydel KB**, **Taylor TE**, **Molyneux ME**, **Kain KC**. Angiopoietin-2 levels are associated with retinopathy and predict mortality in Malawian children with cerebral malaria: a retrospective case-control study. *Crit Care Med* 40: 952–959, 2012.

577. **Conroy AL**, **Lafferty EI**, **Lovegrove FE**, **Krudsood S**, **Tangpukdee N**, **Liles WC**, **Kain KC**. Whole blood angiopoietin-1 and -2 levels discriminate cerebral and severe (non-cerebral) malaria from uncomplicated malaria. *Malar J* 8: 295, 2009.

578. **Jain V**, **Lucchi NW**, **Wilson NO**, **Blackstock AJ**, **Nagpal AC**, **Joel PK**, **Singh MP**, **Udhayakumar V**, **Stiles JK**, **Singh N**. Plasma levels of angiopoietin-1 and -2 predict cerebral malaria outcome in Central India. *Malar J* 10: 383, 2011.

579. **Lovegrove FE**, **Tangpukdee N**, **Opoka RO**, **Lafferty EI**, **Rajwans N**, **Hawkes M**, **Krudsood S**, **Looareesuwan S**, **John CC**, **Liles WC**, **Kain KC**. Serum angiopoietin-1 and -2 levels discriminate cerebral malaria from uncomplicated malaria and predict clinical outcome in African children. *PLoS One* 4: e4912, 2009.

580. **Ouma BJ**, **Ssenkusu JM**, **Shabani E**, **Datta D**, **Opoka RO**, **Idro R**, **Bangirana P**, **Park G**, **Joloba ML**, **Kain KC**, **John CC**, **Conroy AL**. Endothelial Activation, Acute Kidney Injury, and Cognitive Impairment in Pediatric Severe Malaria. *Crit Care Med* 48: e734–e743, 2020.

581. **Prapansilp P**, **Medana I**, **Mai NTH**, **Day NPJ**, **Phu NH**, **Yeo TW**, **Hien TT**, **White NJ**, **Anstey NM**, **Turner GDH**. A clinicopathological correlation of the expression of the angiopoietin-Tie-2 receptor pathway in the brain of adults with Plasmodium falciparum malaria. *Malar J* 12: 50, 2013.

582. **Weinberg JB**, **Yeo TW**, **Mukemba JP**, **Florence SM**, **Volkheimer AD**, **Wang H**, **Chen Y**, **Rubach M**, **Granger DL**, **Mwaikambo ED**, **Anstey NM**. Dimethylarginines: endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis in children with falciparum malaria. *J Infect Dis* 210: 913–922, 2014.

583. **Smith JD**, **Craig AG**, **Kriek N**, **Hudson-Taylor D**, **Kyes S**, **Fagan T**, **Fagen T**, **Pinches R**, **Baruch DI**, **Newbold CI**, **Miller LH**. Identification of a Plasmodium falciparum intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1766–1771, 2000. doi: 10.1073/pnas.040545897.

584. **Joste V**, **Guillochon E**, **Fraering J**, **Vianou B**, **Watier L**, **Jafari-Guemouri S**, **Cot M**, **Houzé S**, **Aubouy A**, **Faucher JF**, **Argy N**, **Bertin GI**. PfEMP1 A-Type ICAM-1-Binding Domains Are Not Associated with Cerebral Malaria in Beninese Children. *mBio* 11, 2020.

585. **Fiedler U**, **Reiss Y**, **Scharpfenecker M**, **Grunow V**, **Koidl S**, **Thurston G**, **Gale NW**, **Witzenrath M**, **Rosseau S**, **Suttorp N**, **Sobke A**, **Herrmann M**, **Preissner KT**, **Vajkoczy P**, **Augustin HG**. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 12: 235–239, 2006.

586. **Armah H**, **Dodoo AK**, **Wiredu EK**, **Stiles JK**, **Adjei AA**, **Gyasi RK**, **Tettey Y**. High-level cerebellar expression of cytokines and adhesion molecules in fatal, paediatric, cerebral malaria. *Ann Trop Med Parasitol* 99: 629–647, 2005.

587. **Armah H**, **Wired EK**, **Dodoo AK**, **Adjei AA**, **Tettey Y**, **Gyasi R**. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *Int J Environ Res Public Health* 2: 123–131, 2005.

588. **Avril M**, **Bernabeu M**, **Benjamin M**, **Brazier AJ**, **Smith JD**. Interaction between Endothelial Protein C Receptor and Intercellular Adhesion Molecule 1 to Mediate Binding of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes to Endothelial Cells. *mBio* 7, 2016.

589. **Bernabeu M**, **Danziger SA**, **Avril M**, **Vaz M**, **Babar PH**, **Brazier AJ**, **Herricks T**, **Maki JN**, **Pereira L**, **Mascarenhas A**, **Gomes E**, **Chery L**, **Aitchison JD**, **Rathod PK**, **Smith JD**. Severe adult malaria is associated with specific PfEMP1 adhesion types and high parasite biomass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E3270-3279, 2016.

590. **Bernabeu M**, **Smith JD**. EPCR and Malaria Severity: The Center of a Perfect Storm. *Trends Parasitol* 33: 295–308, 2017.

591. **Storm J**, **Jespersen JS**, **Seydel KB**, **Szestak T**, **Mbewe M**, **Chisala NV**, **Phula P**, **Wang CW**, **Taylor TE**, **Moxon CA**, **Lavstsen T**, **Craig AG**. Cerebral malaria is associated with differential cytoadherence to brain endothelial cells. *EMBO Mol Med* 11, 2019.

592. **Tuikue Ndam N**, **Moussiliou A**, **Lavstsen T**, **Kamaliddin C**, **Jensen ATR**, **Mama A**, **Tahar R**, **Wang CW**, **Jespersen JS**, **Alao JM**, **Gamain B**, **Theander TG**, **Deloron P**. Parasites Causing Cerebral Falciparum Malaria Bind Multiple Endothelial Receptors and Express EPCR and ICAM-1-Binding PfEMP1. *J Infect Dis* 215: 1918–1925, 2017.

593. **Turner L**, **Lavstsen T**, **Berger SS**, **Wang CW**, **Petersen JEV**, **Avril M**, **Brazier AJ**, **Freeth J**, **Jespersen JS**, **Nielsen MA**, **Magistrado P**, **Lusingu J**, **Smith JD**, **Higgins MK**, **Theander TG**. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature* 498: 502–505, 2013.

594. **Bertin GI**, **Lavstsen T**, **Guillonneau F**, **Doritchamou J**, **Wang CW**, **Jespersen JS**, **Ezimegnon S**, **Fievet N**, **Alao MJ**, **Lalya F**, **Massougbodji A**, **Ndam NT**, **Theander TG**, **Deloron P**. Expression of the domain cassette 8 Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 is associated with cerebral malaria in Benin. *PLoS One* 8: e68368, 2013.

595. **Lavstsen T**, **Turner L**, **Saguti F**, **Magistrado P**, **Rask TS**, **Jespersen JS**, **Wang CW**, **Berger SS**, **Baraka V**, **Marquard AM**, **Seguin-Orlando A**, **Willerslev E**, **Gilbert MTP**, **Lusingu J**, **Theander TG**. Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E1791-1800, 2012.

596. **Moussiliou A**, **Alao MJ**, **Denoeud-Ndam L**, **Tahar R**, **Ezimegnon S**, **Sagbo G**, **Amoussou A**, **Luty AJF**, **Deloron P**, **Tuikue Ndam N**. High plasma levels of soluble endothelial protein C receptor are associated with increased mortality among children with cerebral malaria in Benin. *J Infect Dis* 211: 1484–1488, 2015.

597. **Esmon CT**. The protein C pathway. *Chest* 124: 26S-32S, 2003.

598. **Moxon CA**, **Wassmer SC**, **Milner DA**, **Chisala NV**, **Taylor TE**, **Seydel KB**, **Molyneux ME**, **Faragher B**, **Esmon CT**, **Downey C**, **Toh C-H**, **Craig AG**, **Heyderman RS**. Loss of endothelial protein C receptors links coagulation and inflammation to parasite sequestration in cerebral malaria in African children. *Blood* 122: 842–851, 2013.

599. **Aird WC**, **Mosnier LO**, **Fairhurst RM**. Plasmodium falciparum picks (on) EPCR. *Blood* 123: 163–167, 2014.

600. **Hansson HH**, **Turner L**, **Møller L**, **Wang CW**, **Minja DTR**, **Gesase S**, **Mmbando B**, **Bygbjerg IC**, **Theander TG**, **Lusingu JPA**, **Alifrangis M**, **Lavstsen T**. Haplotypes of the endothelial protein C receptor (EPCR) gene are not associated with severe malaria in Tanzania. *Malaria Journal* 14: 474, 2015.

601. **Kaminski L-C**, **Riehn M**, **Abel A**, **Steeg C**, **Yar DD**, **Addai-Mensah O**, **Aminkiah F**, **Owusu Dabo E**, **Jacobs T**, **Mackroth MS**. Cytotoxic T Cell-Derived Granzyme B Is Increased in Severe Plasmodium Falciparum Malaria. *Front Immunol* 10: 2917, 2019.

602. **Morrow JD**, **Hill KE**, **Burk RF**, **Nammour TM**, **Badr KF**, **Roberts LJ**. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9383–9387, 1990.

603. **Plewes K**, **Kingston HWF**, **Ghose A**, **Maude RJ**, **Herdman MT**, **Leopold SJ**, **Ishioka H**, **Hasan MMU**, **Haider MS**, **Alam S**, **Piera KA**, **Charunwatthana P**, **Silamut K**, **Yeo TW**, **Faiz MA**, **Lee SJ**, **Mukaka M**, **Turner GDH**, **Anstey NM**, **Jackson Roberts L**, **White NJ**, **Day NPJ**, **Hossain MA**, **Dondorp AM**. Cell-free hemoglobin mediated oxidative stress is associated with acute kidney injury and renal replacement therapy in severe falciparum malaria: an observational study. *BMC Infect Dis* 17: 313, 2017.

604. **Moreira AS**, **Estato V**, **Malvar DC**, **Sanches GS**, **Gomes F**, **Tibirica E**, **Daniel-Ribeiro CT**, **Carvalho LJM**. L-arginine supplementation and thromboxane synthase inhibition increases cerebral blood flow in experimental cerebral malaria. *Scientific Reports* 9: 13621, 2019.

605. **Lu SC**. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 30: 42–59, 2009.

606. **Zitka O**, **Skalickova S**, **Gumulec J**, **Masarik M**, **Adam V**, **Hubalek J**, **Trnkova L**, **Kruseova J**, **Eckschlager T**, **Kizek R**. Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol Lett* 4: 1247–1253, 2012.

607. **Glosli H**, **Tronstad KJ**, **Wergedal H**, **Müller F**, **Svardal A**, **Aukrust P**, **Berge RK**, **Prydz H**. Human TNF-alpha in transgenic mice induces differential changes in redox status and glutathione-regulating enzymes. *FASEB J* 16: 1450–1452, 2002.

608. **Oakley MS**, **Anantharaman V**, **Venancio TM**, **Zheng H**, **Mahajan B**, **Majam V**, **McCutchan TF**, **Myers TG**, **Aravind L**, **Kumar S**. Molecular Correlates of Experimental Cerebral Malaria Detectable in Whole Blood. *Infect Immun* 79: 1244–1253, 2011.

609. **Oliveira KRHM**, **Kauffmann N**, **Leão LKR**, **Passos ACF**, **Rocha FAF**, **Herculano AM**, **do Nascimento JLM**. Cerebral malaria induces electrophysiological and neurochemical impairment in mice retinal tissue: possible effect on glutathione and glutamatergic system. *Malar J* 16: 440, 2017.

610. **Zanini GM**, **Martins YC**, **Cabrales P**, **Frangos JA**, **Carvalho LJM**. S-nitrosoglutathione prevents experimental cerebral malaria. *J Neuroimmune Pharmacol* 7: 477–487, 2012.

ANNEXES

Annexe 1 : Article décrivant le protocole du projet NEUROCM (Joste *et al*, 2019 (7))

BMJ Open

Identification of Plasmodium falciparum and host factors associated with cerebral malaria: description of the protocol for a prospective, case-control study in Benin (NeuroCM)

Valentin Joste,[1] Laurine Maurice,[1,2] Gwladys I Bertin,[1] Agnès Aubouy,[2] Farid Boumédiène,[3] Sandrine Houzé,[1,4] Daniel Ajzenberg,[3] Nicolas Argy,[1,4] Achille Massougbodji,[5] Ida Dossou-Dagba,[6] Maroufou Jules Alao,[7] Michel Cot,[1] Philippe Deloron,[1] Jean-François Faucher,[3,8] on behalf of the NeuroCM group

To cite: Joste V, Maurice L, Bertin GI, *et al*. Identification of Plasmodium falciparum and host factors associated with cerebral malaria: description of the protocol for a prospective, case-control study in Benin (NeuroCM). *BMJ Open* 2019;**9**:e027378. doi:10.1136/bmjopen-2018-027378

► Prepublication history for this paper is available online. To view these files, please visit the journal online (http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2018-027378).

Received 25 October 2018
Revised 8 April 2019
Accepted 9 April 2019

Check for updates

© Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to
Valentin Joste;
valentinjoste@gmail.com
and Professor Jean-François Faucher;
jean-francois.faucher@unilim.fr

ABSTRACT

Introduction In 2016, an estimated 216 million cases and 445 000 deaths of malaria occurred worldwide, in 91 countries. In Benin, malaria causes 26.8% of consultation and hospitalisation motif in the general population and 20.9% in children under 5 years old. The goal of the NeuroCM project is to identify the causative factors of neuroinflammation in the context of cerebral malaria. There are currently very few systematic data from West Africa on the aetiologies and management of non-malarial non-traumatic coma in small children, and NeuroCM will help to fill this gap. We postulate that an accurate understanding of molecular and cellular mechanisms involved in neuroinflammation may help to define efficient strategies to prevent and manage cerebral malaria.

Methods and analysis This is a prospective, case-control study comparing cerebral malaria to uncomplicated malaria and non-malarial non-traumatic coma. This study takes place in Benin, precisely in Cotonou for children with coma and in Sô-Ava district for children with uncomplicated malaria. We aim to include 300 children aged between 24 and 71 months and divided in three different clinical groups during 12 months (from December 2017 to November 2018) with a 21 to 28 days follow-up for coma. Study data, including clinical, biological and research results will be collected and managed using CSOnline-Ennov Clinical.

Ethics and dissemination Ethics approval for the NeuroCM study has been obtained from *Comité National d'Ethique pour la Recherche en santé* of Benin (n°67/MS/DC/SGM/DRFMT/CNERS/SA; 10/17/2017). NeuroCM study has also been approved by *Comité consultatif de déontologie et d'éthique* of Institut de Recherche pour le Développement (IRD; 10/24/2017). The study results will be disseminated through the direct consultations with the WHO's Multilateral Initiative on Malaria (TDR-MIM) and Roll Back Malaria programme, through scientific meetings and peer-reviewed publications in scientific or medical journals, and through guidelines and booklets.

Strengths and limitations of this study

- This case-control study aims to identify the causative factors of neuroinflammation in the context of cerebral malaria.
- This study will inform on the aetiologies and management of non-malarial non-traumatic coma in small children.
- The final products of NeuroCM are expected to feed the pipeline of new therapeutical (immune intervention) and preventive (vaccine) strategies that will improve cerebral malaria outcome.
- This study does not have the power to investigate all aetiologies of fever in Benin. Contrary to the malaria groups, there is no information on the frequency of non-malarial non-traumatic coma admissions, and no certainty on the number of children who will be included in the non-malarial non-traumatic group.
- According to the limited number of patients, conclusions will further need to be confirmed in larger studies.

INTRODUCTION

Malaria is triggered by an apicomplexan parasite, *Plasmodium* spp. Six *Plasmodium* species can infect humans, with *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) being the most frequent in Sub-Saharian Africa (99.7% of estimated cases in 2017). *P. falciparum* is the agent of severe malaria and responsible for most malarial deaths.

In 2017, an estimated 219 million cases and 435 000 deaths of malaria occurred worldwide, in 91 countries.[1] Despite a recent decrease in malaria mortality due to extensive malaria control through insecticide impregnated bednets and increased use of

Table 1 Clinical and laboratory criteria for severe malaria (from (4))

Clinical manifestations	Prognosis value	Frequency in children
Impaired consciousness	+++	+++
Respiratory distress	+++	+++
Multiple convulsions	+	+++
Prostration	+	+++
Shock	+++	+
Pulmonary oedema (radiology)	+++	+/–
Abnormal bleeding	+++	+/–
Jaundice	++	+
Laboratory indices	**Prognosis value**	**Frequency**
Severe anaemia (haemoglobin <5 g/dL or haematocrit <15%)	+	+++
Hypoglycaemia (<40 mg/dL)	+++	+++
Acidosis (bicarbonate <15 mM)	+++	+++
Hyperlactataemia (lactates >5 mM)	+++	+++
Renal impairment (creatinin >3 mg/dL)	++	+
Hyperparasitaemia (parasitaemia >10%)	+/-	++

Table 2 Blantyre score (from (4))

	Score
Best motor response	
Localises painful stimulus	2
Withdraws limb from pain	1
Non-specific or absent response	0
Verbal response	
Appropriate cry	2
Moan or inappropriate cry	1
None	0
Eye movement	
Directed	1
Not directed	0
Total	0–5

artemisinin derivatives, 275 000 children still die every year from malaria. Most cases and deaths were in African region (respectively 92% and 93%). Severe malaria occurs mostly in non-immune patients and in Sub-Saharian Africa and 90% of severe malaria affect young children.[2] In endemical states, malaria is one of the three major causes of hospitalisation in children under 5 years old.

Benin is in West Africa, along the Gulf of Guinea In 2018, 11.5 million people live in Benin, most of them in South Benin. Malaria transmission occurs seasonally, during rainy seasons (from May to August and October). According to the Beninese health department in 2016, malaria is responsible for 26.8% of disease reports in consultation and hospitalisation in the general population and for 20.9% in children under 5 years old.[3] It is also the first morbidity cause in the general population with a prevalence of 39.7% in 2013, followed by respiratory infections in 12.4% cases and gastro-intestinal disease for 6.4%.[4]

According to the WHO, severe *falciparum* malaria is defined by the association between *P. falciparum* asexual parasitaemia and the presence of one or more of the clinical or laboratory features (with no other confirmed cause for their symptoms) presented in table 1. Cerebral malaria (CM) is defined by the presence of asexual form of *P. falciparum* associated with Blantyre score ≤2 (table 2). CM is a coma which persists for >1 hour after a seizure irrespective of anticonvulsant medications. Clinical criteria for CM diagnosis are currently debated, and it has been highlighted that a *P. falciparum* parasitaemia can be observed in comatose children with coma related to a non-malarial central nervous system disease,[5] leading to a possible overestimation of CM cases. A recent study in Malawi found that 25% of CM cases were misdiagnosed and that many children may have had a viral meningoencephalitis concomitant to a malarial infection.[5] Implementation of fundoscopic examination (in order to look for malaria retinopathy signs)[6] and microbiological investigations (blood culture, cerebrospinal fluid (CSF) culture, CSF multiplex polymerase chain reaction (PCR)) could limit the overestimation of CM diagnosis, but fundoscopic examination requires trained physicians and microbiological investigations are expensive. Clinical research needs to focus on new clinical or diagnostical tools designed to help physicians in order to better diagnose CM.

NeuroCM study aims to collect data (such as blood and cerebrospinal fluid culture, fundoscopic examination) on coma's aetiologies in Beninese young children.

Without treatment, CM is invariably fatal. Even with parenteral artemisinin use, severe malaria death rate is 20%.[7] In case of severe malaria or CM, patients should be hospitalised in an intensive care unit. Conscience status, blood pressure, heart and respiratory rates, diuresis and oxygen saturation have to be monitored every 6 hours.[8] Parenteral artemisinin instead of quinine is recommended at a posology of 2.4 mg/kg by injection (3 mg/kg in children under 20 kg of body weight) at diagnosis, 12 and 24 hours later and then daily until patients can take oral drugs.[7] Benzodiazepine should be used to treat convulsions (diazepam 0.3 mg/kg, midazolam or lorazepam). It seems accepted that CM surviving patients generally do not present any neurological sequelae and fully recover their neurological capacity. However, immediate neurological after-effect is described in 6.7% to 11.6% of cases[7 9] and a recent meta-analysis found a relation between CM and neurological disease.[10] The

NeuroCM study will collect data on children's clinical recovery at discharge and 21 to 28 days later.

Tools for malaria control are less and less effective. On one hand, *P. falciparum* drug resistance is a growing concern. Resistance to chloroquine, one of the main anti-malarial drugs, appeared during the sixties in South-East Asia and then spread to Africa.[11 12] Artemisinin-combined therapy became the treatment of choice for malaria with the aim to reduce the risk of parasites developing resistance,[13] but resistance appeared in South-East Asia in 2008[14] and was confirmed in others studies.[15] It has not, hitherto, spread to Africa but this is a real concern for the WHO.[16] On the other hand, mosquitos become more and more resistant to insecticides, making antivectorial prevention more and more difficult.[17] Thus, research for new therapies is needed.

Pathophysiology of CM is complex and multifactorial, based on both parasite and host immune factors. It is currently believed that CM is caused by dedicated parasite variants that specifically localise in brain through interaction between parasite proteins expressed on the surface of the infected erythrocytes (iE) and brain endothelium. This sequestration occurs with erythrocytes infected with late stage of *P. falciparum* (trophozoites and schizonts). Binding of iE to endothelial vascular cells is mediated by variant surface antigens (VSA). *Plasmodium* virulence is linked to its ability to express VSA.[18] VSA include three different multigenic families: *var*, *rifin* and *stevor*. More specifically, *var* genes coding for *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) proteins are highly polymorphical and present in sixty copies in *P. falciparum* genome. Those PfEMP1 are expressed on iE surface and are responsible for endothelial receptors binding, such as chondroitin sulfate A (CSA) and endothelial protein C receptor (EPCR) or intercellular adhesion molecule (ICAM) respectively involved in placental malaria[19] and severe malaria.[20] PfEMP1 family has been clearly associated with binding of iE to the microvascular endothelium of every organ and tissue.[21] We now better understand iE's binding on placenta[22] and vaccine development to prevent gestational malaria seems an achievable goal. By contrast, research is still needed to understand which type of proteins specifically binds to cerebral endothelial receptor. In a previous study conducted in Benin, we identified several proteins associated with CM.[23]

The finding of a PfEMP1 variant specifically related to CM could pave the way to the development of a vaccine targeting this specific protein. Studying the transcriptomical and proteomical profiles of plasmodial strains involved in CM compared with strains involved in uncomplicated malaria (UM) is a first step to better understand related mechanisms to cerebral endothelium binding.

The host immune aspect of the pathophysiology of CM are the consequences of microvascular sequestration of iEs and rosettes (non-infected red blood cells) in brain. Such sequestration leads to blood flow obstruction, ischaemia/hypoxia and local inflammation resulting in neuroinflammation.[24–28] The way this cascade of events is linked and the reasons why they result in death or inflammation resolution remains to be elucidated. Acute cerebral ischaemia is known to drive microglia activation and influx of myeloid immune cells to the brain. Resident microglia and infiltrating monocytes/neutrophils have a critical role in initiating, sustaining (M1 polarisation) and resolving (M2 polarisation) post-ischaemic inflammation.[29–31] Another important immune aspect of neuroinflammation during CM is redox equilibrium. The production of reactive oxygen species both by parasites (haemoglobin digestion) and monocytes/macrophages are thought to cause damages to neurons.[32] This process leads to blood-brain barrier (BBB) permeability and neurodegeneration.[33 34] In order to counterbalance the excess of oxidants, oxidant scavengers and antioxidant enzymes may be produced. NO bioinsufficiency and subsequent vasoconstriction constitute other important aspects of CM pathophysiology.[35] Haem and superoxide anion release during infection leads to NO mobilisation for detoxification, depriving vascular smooth muscle cells in NO and leading to inflammation-related vasospasm.[35 36] Although vasospasm has not been clearly associated to death risk during CM,[37] NO pathway deserves a better understanding during CM pathophysiology. In the NeuroCM study, we intend to better understand mechanisms of neuroinflammation and its resolution in a context of CM, by comparing data collected in children presenting with CM, in children hospitalised for non-malarial non-traumatic coma and in children with UM. We will focus our studies on markers of immune cell migration and polarisation (towards inflammatory or resolutive phenotypes), of pro- or anti-oxidant response and of pro- or anti-inflammatory response through urine and blood samples analysis at inclusion, 3 and 21 to 28 days post-inclusion.

STUDY OBJECTIVES

The main objective is to identify the causative factors of neuroinflammation in the context of CM. There are currently very few systematic data from West Africa on the aetiologies and management of non-traumatic coma in small children, and NeuroCM will bring new information on these aspects. We postulate that an accurate understanding of molecular and cellular mechanisms involved in neuroinflammation may help to define efficient strategies to prevent and manage CM.

There are three distinct objectives in this study.

To identify parasitological factors associated with P. falciparum CM or UM

We expect to identify and validate *P. falciparum* virulence factors associated with CM by comparison with UM. Once proteins of interest will be found, functional studies will help to better understand their role in CM.

To identify immune host factors associated with fatal of favourable outcome of CM

We expect to better understand which mechanisms trigger neuroinflammation and its resolution during CM by comparing three groups of children: presenting with CM, hospitalised for non-malarial non-traumatic coma and presenting with UM. We aim to identify therapeutical molecular targets involved in neuroinflammation resolution.

To describe coma's aetiology in Sub-Saharian Africa

We expect to improve knowledge in non-malarial non-traumatic coma's aetiologies in Sub-Saharian Africa in order to improve young children's coma management and inform health public policies on the role played by infections that could be prevented by vaccination.

METHODS AND ANALYSIS

Design

This is a prospective, case-control study comparing CM to UM and non-malarial non-traumatic coma. Patients will be recruited in South Benin, in two different hospitals for coma and in a dispensary for UM, as UM is rarely detected in hospitals where children with coma are managed. This study is conducted by one Beninese research team (CERPAGE, Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance) and three French research teams (UMR D216 MERIT in Paris carrying the project, UMR D152 PHARMADEV in Toulouse, UMR S1094 NET in Limoges).

Study environment

This study takes place in Benin, precisely in Cotonou and Calavi for the hospital's recruitment. UM recruitment takes place in Sô-Ava district. Cotonou is the largest city and economical centre of Benin, with an estimated population of 679 012 habitants in 2013.

The two recruitment hospitals are the CHU-MEL (CHU-Mère et Enfant de la Lagune) and Hôpital de zone de Calavi. Routine laboratory analysis, except bacteriology, are performed on site for children included with coma and at IRCB (Institut de Recherche Clinique du Bénin) for children with UM. Bacteriological analyses are performed in the microbiology laboratory of CNHU (Centre National Hospitalier Universitaire). Research analyses are done in the CERPAGE laboratory.

Participants

We aim to include three different clinical groups of 100 children between 24 and 71 months during 12 months (from December 2017 to November 2018). This duration has been determined according to previous studies in Benin.[38]

In the **first group**, a diagnosis of CM will be defined as follows: positive *P. falciparum* thin blood smear with a Blantyre score ≤2 with exclusion of patients presenting: positive bacteraemia, meningitidis proved or suspected (leucocytes in cerebrospinal fluid >1000 per microlitre and/or Gram positive in CSF and/or CSF bacterial culture positive and/or PCR positive for any bacteria or virus).

In the **second group**, a diagnosis of non-malarial non-traumatic coma will be defined as follows: Blantyre score ≤2 and no *Plasmodium* infection as detected by thin blood smear.

In the **third group** UM will be defined as follows: (1) fever at inclusion or within 24 hours before, (2) no clinical or biological sign of severe malaria (table 1), no danger signs and no other obvious cause of fever and (3) *P. falciparum* parasitaemia between 1000 to 500 000 parasites per microlitre.

Inclusion and exclusion criteria

For all children, the first inclusion criterion is parental acceptance that their child participate in the study after information has been given (see section 'Ethics and safety considerations'). Inclusion criteria for coma (CM and non-malarial non-traumatic coma) are: age between 24 to 71 months, Blantyre score ≤2, negative HIV rapid diagnostic test (RDT). Non-inclusion criteria are: pre-existent neurological disease and traumatical or toxical coma.

Inclusion criteria for UM are: age between 24 to 71 months, fever >38°C at inclusion or within 24 hours before and no clinical severity/danger sign, positive malaria RDT and negative HIV RDT.

Exclusion criteria for coma are: thick and thin blood smear not realised at day 0 (D0) and/or biological blood test not realised at D0 and/or research blood test not realised at D0.

Exclusion criteria for UM are: thick and thin blood smear not realised at D0 and/or biological blood test not realised at D0 and/or research blood test not realised at D0 and/or laboratory indices for severe malaria and/or thick and thin blood smear negative for *P. falciparum* and/or parasite density under 1000 parasite per microlitre or higher than 500 000 parasites per microlitre. To evidence a significant difference between CM and UM groups in the ratio of endogenous mediators associated with inflammation resolution, we estimated that a sample size of 100 subjects per group was sufficient to reach the main study target, that is, by linear regression analysis involving a maximum of six predictors and an R^2 value of 0.400, ensuring an 80% power and a 5% probability of type I error. This sample size also complies with the requirements of the reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis used to validate the discrimination of CM and UM samples obtained by SARTools, and finally with the overall funding request of the project.

Recruitment process

Step 1: enrolment/screening

For CM and non-malarial non-traumatic coma group, every young child with neurological symptoms is screened for eligibility. For UM group, every child presenting at the outpatient clinic with fever or fever during the previous 24 hours is screened. The first step is patients' screening to confirm study eligibility and provide participants with

information about the study. A questionnaire assessing eligibility will inform on home addresses, sociodemographical data (number of children in the family, ethnical group…), clinical history, use of mosquito net and vaccination status. Informed consent is then obtained from the parents or caregivers.

The following tests are performed to screen for malaria and to rule out HIV infections: a RDT detecting histidin-rich protein 2 (HRP2) for *P. falciparum* detection and Determine HIV-1/2 set, Alere for HIV detection.

Step 2: clinical examination and biological sample/analysis

A clinical examination is performed by a study physician for children hospitalised with coma, and by a study nurse for UM. In the coma group, a fundoscopic assessment is performed (Eyepax 1.0 Dioptrix) and pictures are captured and downloaded on an online database. The clinical data entry is performed on an online case report form.

In order to allocate children to their respective groups, biological analyses according to severe malaria are needed. For coma's inclusion: thick and thin blood smear analysis, complete blood count (CBC) (Sysmex KX-21N, Sysmex XT-1800i and ABS Micro ES 60), biochemistry analysis (Na^+, K^+, Cl^-, Ca^{++}, HCO_3^-, albumin, urea, creatinine, glucose, lactate) with Piccolo Sysmex and ALAT plus bilirubin (Biolabo Kenza Max biochemistry and Mindray BS-200) are performed on site. Blood culture, Gram staining and bacterial culture for CSF are realised in a university hospital reference laboratory. Biomérieux Biofire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel multiplex PCR (looking for *E. coli*, *H. influenzae*, *L. monocytogenes*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae,* cytomegalovirus, enterovirus, Epstein-Barr virus, herpes simplex virus (HSV) 1, HSV2, human herpesvirus 6, paraechovirus, varicella zona virus and *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii)* will be further performed in France. The required following samples are needed: one Etylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) tube (2 mL) for CBC and malaria diagnostic, one heparin tube (2 mL) for biochemistry analysis, one cerebrospinal sample (1 mL), one blood sample for blood culture (5 mL) for routine analyses, two additional EDTA tubes (6 mL) and 50 mL of urine for research analyses.

For UM inclusions: severe malaria was ruled out according to results from blood cell count (Sysmex XS500i), biochemistry analysis (bilirubin, glucose, creatinine) on Selectra pro automate (Elitech group) and thick and thin blood smear. The following samples are needed: one EDTA tube (2 mL), one heparin tube (2 mL) and one fluorinated tube (2 mL) for routine analyses, two additional EDTA tubes (6 mL) and 50 mL of urine for research analyses.

Step 3: research analyses

A part of research analyses is realised in CERPAGE laboratory. Blood, 1 to 1.5 mL, is cultured in supplemented Roswell Park Memorial Institute 1640 medium with Albumax (Gibco) for less than 48 hours until parasites reach the mature stage (from young trophozoite to schizont), then purified using magnetic-activated cell sorting (MACS; Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for binding and endothelial cell activation assay. The resulting mature stage are stored at −80°C for further mass spectrometry protein analysis. Whole blood samples of 200 µL are conserved at −20°C for DNA analysis, 200 µL are transferred in TRIzol reagent (Life technologies, France) and stored at −80°C for further RNA extraction[39] and 200 µL in liquid nitrogen for parasite cryoconservation. Plasma samples are conserved at −20°C and −80°C respectively for immune response analysis and dosage of biomarkers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are separated from red blood cells by Ficoll density gradient and stored in liquid nitrogen. Finally, urines are stored at −80°C for further analysis. See table 3 for detailed research planning.

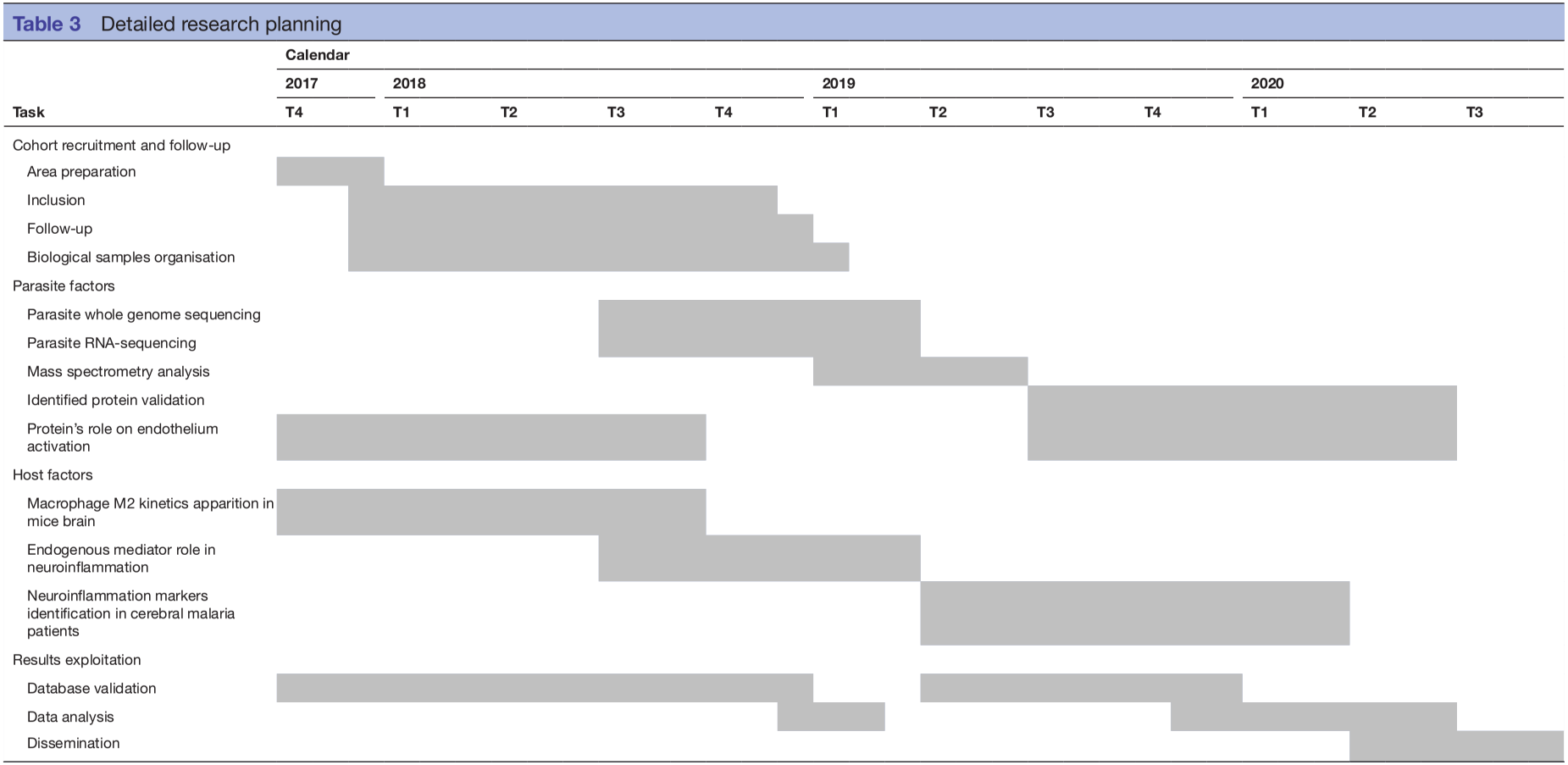
Parasite factors analyses will be performed in several ways. We will compare CM and UM isolates with whole genome DNA sequencing; RNA-sequencing and by quantitative MS analysis. Highly polymorphical *var* genes will be assembled and BLASTed against peptide hits from the MS approach. Nucleotide primers will be designed with DNA-sequencing data and used in RT-qPCR to validate the RNA-seq data. Associations between gene polymorphisms and modifications in RNA nature and quantity detected by RNA-seq will be investigated. Then, we will use recombinant protein and *P. falciparum* genome modification by gene disruption to study proteins' role.

Host factors study will be based on the analysis of PBMC, plasmas and urine samples of the three groups of children. PBMC analysis will focus on the phenotyping of monocytes to distinguish M1 and M2-like phenotypes. Flow cytometry will be used to measure expression levels of CD11b and CD16 as M1 markers, and CD163 and CD206 as M2 markers. The assessment of gene expression levels of cytokines, chemokines and their receptors by RT-qPCR will complete phenotype analysis. Plasmas and urine samples will allow to measure redox (L-arginine and biopterins), pro-/anti-inflammatory (cytokines, chemokines and lipid mediators such as eicosanoids) and pro-resolving mediators (such as prostaglandins and lipoxins) by ELISA or EIA. We will first compare data from the group of CM to the two other groups in order to identify the biological markers best related to inflammation and neurological impairment during CM. Second, we will analyse data obtained with the two coma groups at inclusion (Day 0), at Day 3 and Day 30 to understand the kinetics of immune events and its relation to death or favourable outcome. Finally, we will search for severity and death risk factors within the CM groups.

Step 4: coma follow-up

In children presenting with coma, both clinical data and blood samples are collected at day 3 (D3) and day 21 to 28 (D21-28) on disease outcome, and for research purpose. One EDTA tube (6 mL) and 50 mL urine will be sampled.

Table 3 Detailed research planning



In order to prevent losses, parents/guardians are called a few days before D21-28 to remind them of follow-up visit. No follow-up visit is scheduled for children with UM.

Data management

Data, including clinical, biological and research results are collected and managed using CSOnline-Ennov Clinical (https://ufrcb.chu-limoges.fr/crfonline/). It is a secure, web-based application designed to support data capture for research studies. Study participants are identified by a code and have their own account. The two physicians and the nurse were trained to entry the data on included children in the database. Nobody can delete a patient created in the base, except the data manager.

Data & Safety Monitoring Board, composed by two physicians specialised in infectious disease and one statistician, will review allocation of children to the pre-defined study groups and discuss possible deviations from the expected number of subjects in the groups.

Data analysis

In a first step, descriptive statistics will be realised by calculating mean and SD for quantitative variables, and proportion for qualitative variables to determine the main characteristics of the three clinical groups.

Focusing on cerebral malaria and UM children the MS/MS data will be searched against the databases (UNIPROT and PlasmoDB,[40] the proteins will be considered as positive hits with at least two peptides. The MaxQuant software will be used to compare malaria protein expression between isolates of these two clinical groups. Transcriptomical data will be analysed with Galaxy (https://usegalaxy.org/) and R software (https://www.r-project.org/).[41] The raw data will be trimmed with Trimmomatic tool for Phred Quality Score Qscore >20, read length >30 bases and ribosome sequences will be removed with tool sortMeRNA. Reads will be mapped against the *P. falciparum* 3D7 reference genome combined with *var* transcript sequences from 7 *P. falciparum* genomes. Differential expression analysis on RNAseq data will be performed using the DESeq2[42] package considering a one log-fold increase as significant using adjusted p value <0.05. Data normalisation will be realised with DESeq2 software, with hypothesis that there exists genes overexpressed and underexpressed and that majority of genes are not expressed in a differential way. Transcript expression levels (evaluated with RT-qPCR) will be compared by t-tests and analysis of variance of transformed outcomes.

Regarding immune response analysis, potential markers related to inflammation and neurological symptoms will be compared using variance analysis in samples from children from the three groups, CM, UM and non-malarial non-traumatic group. The groups will be compared two by two with a linear regression, with a special attention to CM/UM comparison. Adjustment variables such as age, sex, ethnical group, time to hospital transfer, body temperature and co-morbidities will be taken into account in the model. The threshold for significance level will be 0.05, and a Bonferroni correction will be applied to take into account multiple testing. It will be further determined if a global comparison between the three groups will be made. Generally speaking, the non-malarial non-traumatic coma group will be used as a comparator to analyse specific effect of malaria in neuroinflammation development. The second major question to be answered to is, within the CM group, whether the changes of the inflammation markers between D0 (admission) and D3 are predictive of the outcome (survival/death). A logistical model (univariate then multivariate) will be used for this analysis. The same adjustment variables will be used as in the comparison between groups. The dependent variable will be the outcome survival/death.

The last model (also a logistical regression) will study the changes in inflammation markers between D3 and D21 in the survivors in order to determine if they are predictive of a favourable evolution. The dependent variable will be the outcome, here the discharge from the hospital without apparent sequelae.

Missing data are not expected to affect more than 10% of the records for the main factors that will be analysed. Should they be over 5%, an imputation method such as the minimum information for publication of quantitative real time pcr experiments (MIQE) method will be applied, as the errors can be considered at random.[43] No proteomic analysis for immune marker will be done.

Patient and public involvement

From patients' experience and preference, follow-up of children admitted with coma was scheduled in order to be able to detect neurological sequelae. The diagnostical workup proposed to all children included into the study, although not affordable to all patients in routine practice, met parent's expectations on what heath facilities should provide to all patients. All patients were recruited in health facilities where they usually seek care, and to that respect patients were involved in their recruitment process. Finally, results will not be disseminated directly to study participants but through peer-reviewed scientific journal and conference presentations.

ETHICS AND DISSEMINATION

Safety considerations

Parents/guardians will be given an oral information by the physician or the nurse and an opportunity to ask question and refuse the protocol. Patient's confidentiality will be ensured and anonymity guaranteed by anonymous coding given at the inclusion.

Dissemination

The main benefits of NeuroCM are targeted on people living in malaria endemic countries. The study results will be disseminated through a variety of instruments to ensure that a broad range of both specialists and non-specialists are informed and can properly benefit from the findings. First, through the direct consultations with the WHO's

TDR-MIM, Roll Back Malaria programme to reach the wider public health audience; through scientific meetings and peer-reviewed publications in scientifical or medical journals to reach the scientifical/medical/public health communities; through guidelines targeting the medical and paramedical staff for optimisation of severe malaria management, through booklets (eg, first aid procedures and adapted behaviour in case of emergency) elaborated and adapted to the population of Benin.

DISCUSSION

CM is the most life-threatening form of malaria with high mortality rate in young children. Mortality related to malaria is still high in children population and accurate CM diagnosis remains challenging. Among CM surviving children, up to 25% have long-term neuro-cognitive deficits (visual/hearing/cognitive/language impairment/ataxia/hemiparesis/motor deficit…), and 10% show evidence of mental health disorders.[44] As CM might be one of the more common causes of epilepsy in malaria-endemic regions, the burden of CM neurological sequelae may be largely underestimated, but difficult to estimate because diagnosis is challenging in malaria-endemic regions. Bacterial or viral central nervous system infections may occur in children with malarial infection; this may not only originate overdiagnosis of CM, but also may overlook potential bacterial and viral central nervous system infections.

Patients were included in different areas reflecting the healthcare system in Benin. UM patients could not be included in hospital centres such as the CHU-MEL (Cotonou) hospital, and Calavi's hospital, because outpatients with UM rarely seek care in these centres. In 2014, a pilot study aimed to include UM patients in the Cotonou CHU-MEL, and highlighted the absence of UM cases in hospitals. However, patients from the Sô-Ava areas are referred to the main hospital centres when patients present severe malaria (or any severe illness that cannot be monitored and managed in dispensary). In 2016, we aimed to include patients suffering from cerebral malaria in the Sô-Ava, and realised that first, patients were directly sent to the main hospitals, and second, that it would not be ethical to include severe malaria cases in these health structures due to the facility itself. A multicentre study for UM cases inclusion, using the main patient's origin from the corresponding hospital, would have been more even accurate. This represents a possible limitation of our study.

The expected impact of NeuroCM is of great magnitude. First, NeuroCM is an attempt to propose improvements for the diagnosis of CM. It will provide as far as possible, for the first time in West Africa, an identification of the causes of coma in the study area. Second, thanks to DNA, RNA and protein analyses, NeuroCM will allow to identify new parasite targets for a vaccine to prevent CM. Third, NeuroCM will provide data on the kinetics of appearance of inflammatory and pro-resolving molecular and cellular events in brain during CM. The role of endogenous mediators in neuroinflammation resolution during CM will be clarified, with emphasis on pro-oxidant components and lipid mediators. NeuroCM will also identify markers allowing the definition of an immunological state in the process of neuroinflammation resolution in CM patients. Our experimental murine model will allow the formulation of new hypothesis while proof of concept will be achieved through the correlation of our proposed targets with patient morbidity and mortality parameters. In the future, it may allow clinicians to better manage CM, with specific pro-resolving drugs for instance.

The final products of NeuroCM are expected to feed the pipeline of new therapeutical (immune intervention) and preventive (vaccine) strategies to improve CM outcome, as well as other diseases involving neuroinflammation.

Author affiliations
[1]MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, 75006, Paris, France
[2]PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France, Toulouse, France
[3]Tropical Neuroepidemiology, INSERM UMR 1094, Limoges, France
[4]Parasitology Laboratory, Hopital Bichat - Claude-Bernard, Paris, France
[5]Institut de Recherche Clinique du Bénin, Calavi, Benin
[6]Paediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin
[7]Paediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin
[8]Infectious diseases and tropical medicine department, Limoges University Hospital, Limoges, France

Collaborators NeuroCM group: Dissou Affolabi (Pediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin); Hélène Authier (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France); Linda Ayedadjou (Paediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin); Bibiane Biokou (Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, Benin); Agnès Coste (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France), Jean-Eudes Degbelo (Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Calavi, Benin); Latifou Dramane (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris); Sayeh Jafari-Guemouri (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Claire Kamaliddin (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Elisée Kinkpe (Pediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin); Anaïs Labrunie (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France); Yélé Ladipo (Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, Benin); Thomas Lathiere (Ophtalmology department, Limoges University Hospital, Limoges, France); Audrey Mowendabeka (Paediatric Department, Hopital de la Mère et de l'Enfant, Limoges, France); Jade Papin (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Bernard Pipy (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France); Pierre-Marie Preux (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France); Marie Raymondeau (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France); Jade Royo (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France); Darius Sossou (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris); Brigitte Techer (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Bertin Vianou (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris).

Contributors VJ and JFF drafted the manuscript. GB, AA, SH, DA, NA, MC, PD and JFF revised the manuscript. GB, AA, FB, SH, DA, NA, MC, PD and JFF designed the study. VJ and LM organised the study in the field. AM, IDD and JA implemented the study in the field. All members of the NeuroCM group have substantially contributed to the conception, design or organisation of the study. All authors approved the final version to be submitted to the journal.

Funding This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche, under contract ANR-17-CEI 7-0001-01.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which

permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

REFERENCES

1. World Health Organization. World malaria report. 2018 https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/.
2. Black RE, Cousens S, Johnson HL, *et al*. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 2010;375:1969–87.
3. Beninese health department. Annuaire des statistiques sanitaires. 2016 http://www2.sante.gouv.bj/IMG/pdf/annuaire_stat_pas_2016.pdf.
4. World Health Organization. Stratégie de coopération de l'OMS avec le Bénin: 2016-2019. http://apps.who.int/iris/handle/10665/246191.
5. Mallewa M, Vallely P, Faragher B, *et al*. Viral CNS infections in children from a malaria-endemic area of Malawi: a prospective cohort study. *Lancet Glob Health* 2013;1:e153–60.
6. Beare NA, Taylor TE, Harding SP, *et al*. Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:790–7.
7. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, *et al*. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet* 2010;376:1647–57.
8. World Health Organization. *La prise en charge du paludisme grave - guide pratique*. Troisième édition.
9. Severe malaria. Trop Med Int Health TM IH. 2014;19(Suppl 1):7–131.
10. Christensen SS, Eslick GD. Cerebral malaria as a risk factor for the development of epilepsy and other long-term neurological conditions: a meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2015;109:233–8.
11. Wernsdorfer WH. The development and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol Today* 1991;7:297–303.
12. Mengesha T, Makonnen E. Comparative efficacy and safety of chloroquine and alternative antimalarial drugs: a meta-analysis from six African countries. *East Afr Med J* 1999;76:314–9.
13. World Health Organization. WHO calls for an immediate halt to provision of single-drug artemisinin malaria pills. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr02/en/.
14. Noedl H, Se Y, Schaecher K, *et al*. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008;359:2619–20.
15. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, *et al*. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009;361:455–67.
16. World Health Organization. Status report on artemisinin resistance and ACT efficacy. http://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin-resistance-august2018/en/.
17. Wolrd Health Organization. Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010-2016. http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241514057/en/.
18. Kraemer SM, Smith JD. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:374–80.
19. Tuikue Ndam NG, Salanti A, Bertin G, *et al*. High level of var2csa transcription by *Plasmodium falciparum* isolated from the placenta. *J Infect Dis* 2005;192:331–5.
20. Moussiliou A, Alao MJ, Denoeud-Ndam L, *et al*. High plasma levels of soluble endothelial protein C receptor are associated with increased mortality among children with cerebral malaria in Benin. *J Infect Dis* 2015;211:1484–8.
21. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, *et al*. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002;415:673–9.
22. Tuikue Ndam N, Deloron P. Towards a vaccine against pregnancy-associated malaria. *Parasite* 2008;15:515–21.
23. Bertin GI, Sabbagh A, Argy N, *et al*. Proteomic analysis of *Plasmodium falciparum* parasites from patients with cerebral and uncomplicated malaria. *Sci Rep* 2016;6:26773.
24. White NJ, Turner GD, Day NP, *et al*. Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *J Infect Dis* 2013;208:192–8.
25. Berendt AR, Tumer GD, Newbold CI. CM: the sequestration hypothesis. *Parasitol Today* 1994;10:412–4.
26. Clark IA, Cowden WB, Rockett KA. The pathogenesis of human cerebral malaria. *Parasitol Today* 1994;10:417–8.
27. Beare NA, Harding SP, Taylor TE, *et al*. Perfusion abnormalities in children with cerebral malaria and malarial retinopathy. *J Infect Dis* 2009;199:263–71.
28. Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, *et al*. The neuropathology of fatal cerebral malaria in malawian children. *Am J Pathol* 2011;178:2146–58.
29. McDonough A, Weinstein JR. Neuroimmune response in ischemic preconditioning. *Neurotherapeutics* 2016;13:748–61.
30. Kim E, Cho S. Microglia and monocyte-derived macrophages in stroke. *Neurotherapeutics* 2016;13:702–18.
31. Xia CY, Zhang S, Gao Y, *et al*. Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *Int Immunopharmacol* 2015;25:377–82.
32. Kumar A, Barrett JP, Alvarez-Croda DM, *et al*. NOX2 drives M1-like microglial/macrophage activation and neurodegeneration following experimental traumatic brain injury. *Brain Behav Immun* 2016;58:291–309.
33. Pino P, Taoufiq Z, Nitcheu J, *et al*. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost* 2005;94:336–40.
34. Postma NS, Mommers EC, Eling WM, *et al*. Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharm World Sci* 1996;18:121–9.
35. Eisenhut M. The evidence for a role of vasospasm in the pathogenesis of cerebral malaria. *Malar J* 2015;14:405.
36. Eisenhut M. Vasospasm in cerebral inflammation. *Int J Inflam* 2014;2014:1–14.
37. O'Brien NF, Mutatshi Taty T, Moore-Clingenpeel M, *et al*. Transcranial doppler ultrasonography provides insights into neurovascular changes in children with cerebral malaria. *J Pediatr* 2018;203:116–24.
38. Bertin GI, Lavstsen T, Guillonneau F, *et al*. Expression of the domain cassette 8 *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is associated with cerebral malaria in Benin. *PLoS One* 2013;8:e68368.
39. Ponts N, Chung DW, Le Roch KG. Strand-specific RNA-seq applied to malaria samples. *Methods Mol Biol* 2012;883:59–73.
40. Bertin GI, Sabbagh A, Guillonneau F, *et al*. Differential protein expression profiles between *Plasmodium falciparum* parasites isolated from subjects presenting with pregnancy-associated malaria and uncomplicated malaria in Benin. *J Infect Dis* 2013;208:1987–97.
41. Otto TD, Wilinski D, Assefa S, *et al*. New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Mol Microbiol* 2010;76:12–24.
42. Varet H, Brillet-Guéguen L, Coppée JY, *et al*. SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq Data. *PLoS One* 2016;11:e0157022.
43. van Buuren S, Boshuizen HC, Knook DL. Multiple imputation of missing blood pressure covariates in survival analysis. *Stat Med* 1999;18:681–94.
44. Idro R, Kakooza-Mwesige A, Asea B, *et al*. Cerebral malaria is associated with long-term mental health disorders: a cross sectional survey of a long-term cohort. *Malar J* 2016;15:184.

Annexe 2 : Autres travaux en collaboration menés pendant ma thèse

Article 1 : Camara A, Haddad M, Reybier K, Traoré MS, Baldé MA, **Royo J**, Baldé AO, Batigne P, Haidara M, Baldé ES, Coste A, Baldé AM, Aubouy A. Terminalia albida treatment improves survival in experimental cerebral malaria through reactive oxygen species scavenging and anti-inflammatory properties. Malar J. 2019 Dec 18;18(1):431. doi: 10.1186/s12936-019-3071-9. PMID: 31852507; PMCID: PMC6921526.

Article 2 : Kamaliddin C, Rombaut D, Guillochon E, **Royo J**, Ezinmegnon S, Agbota G, Huguet S, Guemouri S, Peirera C, Coppée R, Broussard C, Alao JM, Aubouy A, Guillonneau F, Deloron P, Bertin GI. From genomic to LC-MS/MS evidence: Analysis of PfEMP1 in Benin malaria cases. PLoS One. 2019 Jun 28;14(6):e0218012. doi: 10.1371/journal.pone.0218012. PMID: 31251748; PMCID: PMC6599223.