

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire qui menace plus d'un milliard d'individus à travers le monde. Annuellement, 300 à 500 millions de personnes sont infectées et environ 700 000 décès sont enregistrés surtout chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique sub-saharienne. Parmi les cinq espèces de *Plasmodium* parasites de l'homme, *P. falciparum* est la plus redoutable et la plus répandue. Face à l'expansion de la résistance des parasites aux médicaments et des vecteurs aux insecticides, l'orientation vers de nouveaux moyens de lutte s'impose et la vaccination constitue une alternative pouvant être combinée avec les stratégies d'éradication actuellement utilisées.

La mise au point d'un vaccin efficace passe par une meilleure connaissance de l'interaction hôte-parasite. Plusieurs études antérieures ont permis la démonstration de l'implication des anticorps dans la protection et l'identification de nombreuses protéines parasitaires dont certains sont des candidats vaccins. Actuellement, aucun candidat vaccin n'a donné de résultats satisfaisants et pour une maîtrise des causes d'échec en matière de vaccinologie antipalustre, la mise en place d'études comparatives entre les sujets prémunis et les populations sensibles à la maladie s'avèrent plus que nécessaires. Ces travaux reposent sur une évaluation de l'antigénicité des protéines parasitaires chez des individus vivant en zone de forte endémicité et chez les habitants des villes très souvent victimes du paludisme sévère. Ces investigations devront être menées sur les formes cliniques simples et sévères, dans l'optique de mettre en évidence des bio-marqueurs à usage diagnostique ou pronostique.

Conduite dans le contexte du paludisme urbain de recrutement hospitalier, la présente étude apporte une contribution à ce type d'approche par une analyse comparative des réponses anticorps dirigés contre des antigènes cibles des globules rouges parasités par *P. falciparum* (GRp). Les analyses sont faites suivant la gravité et l'issue des accès palustres. L'objectif principal est de

rechercher une éventuelle différence de réponse anticorps dirigée contre une cible particulière des GRp et pouvant être associée à la sévérité ou au décès.

I.HISTORIQUE DE L'INFECTION PALUSTRE

Le paludisme est l'une des maladies humaines les plus répandues au monde. Elle touche particulièrement les populations des régions tropicales mais ayant aussi sévi dans les zones à climat tempéré (1).

C'est l'une des maladies les plus anciennement connues. Mentionnée dans les premiers écrits de l'Egypte, de l'Inde et de la Chine, elle a été cliniquement décrite par Hippocrate, 400 ans avant l'ère chrétienne (2).

L'agent pathogène a été découvert par Alphonse Laveran en 1880 (3). En 1897, les anophèles sont reconnus comme étant les vecteurs et en 1922, cinq espèces plasmodiales infectant l'homme ont été décrites. Il faudra près de 60 ans pour comprendre entièrement le cycle parasitaire et ses caractéristiques (4).

Concernant la chimiothérapie, le premier antipaludique véritablement actif n'a été découvert qu'au XVII^e siècle. Cependant bien que les hommes souffrent du paludisme depuis si longtemps, il fallait attendre l'année 1630 pour voir apparaître le premier traitement à base d'écorce de Quinquina découverte par **Don Francisco Lopez**. Deux siècles plus tard, les pharmaciens **Pelletier** et **Caventou** parviennent à isoler le principe actif: la quinine (4).

Deux antipaludiques de synthèse largement utilisés: la chloroquine et l'amodiaquine, font leur apparition en 1944. Malheureusement, dès 1960, certaines souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine ont commencé à surgir en Asie et en Amérique du Sud. Ces chimiorésistances apparaissent simultanément avec les résistances des anophèles au Dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) utilisée depuis 1948 (4).

Dans le domaine de la recherche vaccinale, plusieurs travaux ont été réalisés et parmi les candidats vaccins ayant les plus suscité d'espoir le vaccin Spf66 et le candidat vaccin RTS-S (5, 6). Deux séries de résultats de l'essai en phase 3 du vaccin RTS-S chez les enfants sont publiées. Elles montrent une

efficacité estimée à 55% de diminution de l'ensemble des accès palustres en 12 mois de suivi et une efficacité de 47% contre les accès sévères, potentiellement mortels (6, 7).

II. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE

II. 1 Le paludisme dans le monde

Le paludisme est une affection cosmopolite qui prédomine dans les régions chaudes, mais la situation est constamment évolutive dans la plupart des régions. La répartition géographique est liée aux conditions de survie de l'anophèle femelle vecteur (1).

En Europe et en Amérique du Nord, le paludisme a été éradiqué. En Afrique, le paludisme sévit surtout dans la partie intertropicale. Il est rare en Afrique du Nord où on rencontre surtout les espèces *P. vivax* et *P. malariae*. En Afrique noire, on retrouve *P. falciparum* (95%), *P. malariae* (3%), et *P. ovale* (2%). En Asie, la situation est identique à celle de l'Afrique, avec une prédominance de *P. falciparum* et la présence de *P. vivax*. Le paludisme est aussi présent en Amérique latine, au Moyen-Orient (4).

En 2011, le rapport de l'OMS sur le paludisme souligne qu'une étape importante vers l'atteinte des objectifs internationaux en matière de lutte contre le paludisme. En effet, entre 2000 et 2010, une diminution de plus de 50% des cas cliniques recensés a été observée dans 43 des 99 pays dits endémiques. Pendant cette même période, 8 autres pays ont affiché des tendances à la baisse entre 25 et 50% (8). Les estimations font état de 216 millions d'épisodes palustres en 2010, dont 81% dans la région Afrique de l'OMS. Le nombre des décès dus au paludisme est estimé à 655 000 pour l'année 2010 (dont 91% en Afrique subsaharienne). A l'échelle mondiale, 86% des décès imputables au paludisme concernent essentiellement les enfants âgés de moins de 5 ans (4).

II. 2 Les modalités épidémiologiques du paludisme

Les investigations épidémiologiques ont permis de connaître les niveaux de transmission et d'endémicité palustres dans les régions. Ces données sont indispensables à l'élaboration de stratégies de lutte contre le paludisme et elles permettent de qualifier la maladie d'épidémique, d'endémique ou même de sporadique.

Le paludisme est considéré comme épidémique quand il y a une augmentation brutale du nombre des cas considérés aussi bien du point de vue de la morbidité que de la mortalité.

Selon l'OMS, le paludisme est dit endémique lorsqu'on constate une fréquence appréciable des cas et la persistance de la transmission naturelle pendant plusieurs années consécutives (9). En zone endémique, trois types d'indices sont utilisés pour évaluer l'endémicité palustre:

- l'indice splénique c'est-à-dire le pourcentage de sujets présentant une splénomégalie dans une population donnée; il est surtout recherché chez les enfants de 2 à 9 ans dont l'hypertrophie de la rate reflète mieux les infestations successives que chez les adultes;

- l'indice plasmodique représentant le pourcentage d'individus porteurs de *Plasmodium* dont le sang périphérique; sa détermination nécessite la précision du groupe d'âge étudié;

Tableau I: Classification des régions endémiques suivant les indices spléniques et plasmodiques établis chez les enfants de moins de 10 ans

Zones	Indices spléniques (%)	Indices plasmodiques (%)
Hypoendémique	0-10	<25
Mésoendémique	11-50	25-50
Hyperendémique	51-75	51-75
Holoendémique	>75	>75

- l'indice gamétocytique qui est le pourcentage d'individus montrant des formes parasitaires sexuées ou gamétocytes dans le sang périphérique.

Ces différents indices sont utilisés dans la classification des niveaux d'endémicité palustre par des méthodes comme celle de **Hackett** recommandée par l'OMS et reposant sur le volume de la rate (**Tableau I**).

II. 3 Faciès épidémiologiques du paludisme au Sénégal

Les observations récentes du PNLP ont montré que *P. falciparum* représente près 98% des espèces plasmodiales retrouvées au Sénégal. Le paludisme est endémique dans tout le pays et le niveau de transmission diminue en passant du Nord au Sud (10).

Le faciès épidémiologique dépend des conditions climatiques et du niveau d'applications des politiques de lutte définies par le PNLP. Il existe deux faciès épidémiologiques au Sénégal:

- **Un faciès tropical** au Sud où 30 à 35% de l'ensemble de la pathologie fébrile est due au paludisme. Ce taux peut passer de 10% en saison sèche à 80 % en saison pluvieuse. Dans ces régions, il existe une prémunition solide au-delà de l'âge de 10 ans.

- **Un faciès sahélien** au Centre et au Nord du pays. Dans cette zone, au fur et à mesure que l'on remonte vers le Nord, la prémunition diminue et le caractère instable du paludisme s'accentue. On y observe des épisodes épidémiques au cours des années de forte pluviométrie et les tranches d'âge touchées sont plus larges (10).

La transmission palustre est essentiellement assurée par les anophèles du complexe *Anopheles gambiae sl* (11).

III. BIOLOGIE DU PARASITE

III. 1 Les agents pathogènes

Les agents étiologiques du paludisme sont des protozoaires appartenant au phylum des *Apicomplexa*, à la classe des *Sporozoa*, à l'ordre des *Haemosporidia* et à la famille des *Plasmodiidae*. Ils sont du genre *Plasmodium* et cinq espèces peuvent infecter l'homme, il s'agit de:

- ***P. falciparum*** décrite en 1887 par Welch, elle est l'espèce la plus fréquente en Afrique sub-saharienne. Responsable de 80 à 90% des cas de paludisme, elle est à l'origine des formes graves, voire mortelles en l'absence de traitement.
- ***P. vivax***, décrite en 1890 par Gassia est très répandue dans le monde mais moins que *P. falciparum*. C'est l'agent d'une fièvre tierce bénigne qui évolue avec des rechutes à long terme en raison de l'existence de formes hypnozoïtes qui restent quiescentes au niveau hépatique.
- ***P. malariae*** décrite en 1881 par Laveran, elle est moins fréquente que les deux premières espèces. Elle est responsable de la fièvre quarte et de troubles rénaux.
- ***P. ovale*** est très proche de *P. vivax* avec laquelle elle a été longtemps confondue. Elle a été décrite en 1922 par Stephens. Elle entraîne une fièvre tierce bénigne évoluant à long terme. Elle est moins pathogène que les autres espèces.
- ***P. knowlesi*** décrite en 1930 par Knowles et antérieurement connue chez le macaque, elle a été récemment retrouvée chez l'homme en Malaisie. Elle fut utilisée dans le traitement de la neuro-syphilis dans les années 1930. Génétiquement, c'est une espèce très proche de *P. vivax* et microscopiquement elle ressemble à *P. malariae* (3).

III. 2. Les vecteurs

Ce sont des arthropodes de la famille des Culicidae et du genre *Anopheles*. Ils présentent des métamorphoses complètes et passent au cours de

leur vie par quatre stades successifs: œuf, larve, nymphe et adulte. Les trois premiers stades sont aquatiques tandis que les adultes mènent une vie aérienne.

Sur les 400 espèces d'anophèles recensées à travers le monde, seule une soixante sont des vecteurs connus du paludisme et vingt sont à l'origine de la plupart des cas d'infections chez l'homme. Les espèces les plus fréquemment rencontrées en Afrique sont: *Anopheles arabiensis*, *A funestus*, *A gambiae* (12).

Seule la femelle d'anophèle est hématophage car les protéines du sang de mammifères sont nécessaires au développement de ses ovaires. C'est à cette occasion, qu'elle ingère puis transmet des pathogènes dont les plasmodiums.

III. 3 Le cycle biologique des Plasmodiums

Le cycle de développement des *Plasmodium* se dissocie en deux phases:

- une phase sexuée ou sporogonie, avec multiplication chez l'insecte vecteur
- une phase asexuée ou schizogonie exo-érythrocytaire puis intra-érythrocytaire chez l'hôte vertébré

Certaines caractéristiques du cycle biologique sont typiques de l'espèce plasmodiale en cause. Nous avons défini ci-dessous, le cycle de *P. falciparum* qui demeure la seule espèce étudiée dans le cadre cette thèse (**Figure 1**).

III.3.1 Cycle chez l'anophèle femelle

Le moustique s'infeste en ingérant des gamétoctyes males et femelles. Parvenus dans le tube digestif de l'insecte, chaque gamétoctye évolue soit en macrogamète femelle soit en 8 microgamètes males. La fécondation d'un macrogamète femelle avec un microgamète mâle permet la formation d'un œuf appelé zygote ou ookinète. Il s'agit d'un œuf mobile qui traverse la paroi du tube digestif pour s'enkyster en oocyste sous la membrane basale de l'estomac.

A l'intérieur de chaque oocyste, se différencient plusieurs sporozoïtes qui pourront ensuite être libérés dans l'hémolymph. Ces sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires du moustique d'où ils seront injectés avec la salive lors d'une piqûre infectante.

Chez le moustique, le cycle se déroule en 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et les espèces vectorielles en cause (**Figure 1**).

III. 3. 2 Cycle chez l'homme

Lors d'un repas sanguin chez l'homme, l'anophèle femelle infecté inocule avec sa salive des dizaines de sporozoïtes. Ces sporozoïtes introduits au niveau cutané, gagnent le sang où ils restent pendant une trentaine de minutes. Dans le compartiment sanguin, beaucoup de sporozoïtes seront détruits par les monocytes (**13**).

Certains pénètrent activement différents types cellulaires dans lesquels leur développement sera sans issue. Seuls ceux ayant franchi la barrière des cellules de Küpffer du foie, et ayant pénétré dans les hépatocytes vont continuer leur cycle.

La pénétration du parasite dans l'hépatocyte se ferait via une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte appelée Circum Sporozoïte Protéin (CSP) et un récepteur membranaire de l'hépatocyte exprimé du côté de l'espace en contact avec le sang circulant (**14**).

A l'intérieur de l'hépatocyte, s'effectue la première prolifération intracellulaire du parasite. Cette multiplication donne des dizaines de trophozoïtes hépatiques qui se transforment ensuite en schizontes intra-hépatiques. Les schizontes renferment des merozoïtes qui, lors de l'éclatement de l'hépatocyte envahissent la circulation sanguine.

Cette phase de réplication intra-hépatique est asymptomatique et dure 8 à 15 jours.

A la différence des infections par *P. vivax*, et *P. ovale*, l'espèce *P. falciparum* se caractérise par une absence de formes de persistance au niveau hépatique ou hypnozoïtes. Pour les deux premières espèces, leurs hypnozoïtes peuvent rester à l'état quiescent pendant plusieurs mois avant d'entrer en schizogonie pré-érythrocytaire et provoquer des rechutes (**14**).

Dans le sang, les merozoïtes en provenance du foie pourront infecter des globules rouges et cette invasion initie la phase sanguine du cycle.

Au cours de cette phase intra-érythrocytaire, les merozoïtes se transforment en trophozoïtes qui subissent une division multiple appelée schizogonie. Il y a alors formation de schizontes intra-érythrocytaires renfermant 24 à 32 nouveaux merozoïtes. Arrivé à maturité, le schizonte entraîne une lyse de l'hématie et libère dans le sang les merozoïtes qui pourront entamer de nouveaux cycles érythrocytaires. Ce cycle sanguin asexué dure environ 48 heures pour *P. falciparum*.

Contrairement aux autres espèces plasmodiales, les formes tardives de développement de *P. falciparum* dans l'hématie infectée: trophozoïtes âgés et schizonte, sont le plus souvent séquestrées au niveau de certains capillaires périphériques et dans certains organes comme la rate, le poumon et le cerveau ou même le placenta chez la femme enceinte. Ce phénomène expliquerait la forte prédominance des formes en anneau et des trophozoïtes jeunes dans la circulation sanguine (**15**).

Après plusieurs cycles intra-érythrocytaires asexués, certains merozoïtes subissent une maturation pendant 10 jours. Il s'agit d'une maturation accompagnée d'une différenciation sexuée qui les transforme en gamétocytes mâles et femelles ne pouvant continuer leur développement que chez l'anophèle femelle.

C'est à l'occasion d'une nouvelle piqûre chez l'homme infecté que, ces gamétocytes mâles et femelles seront ingérés par l'anophèle (**figure 1**).

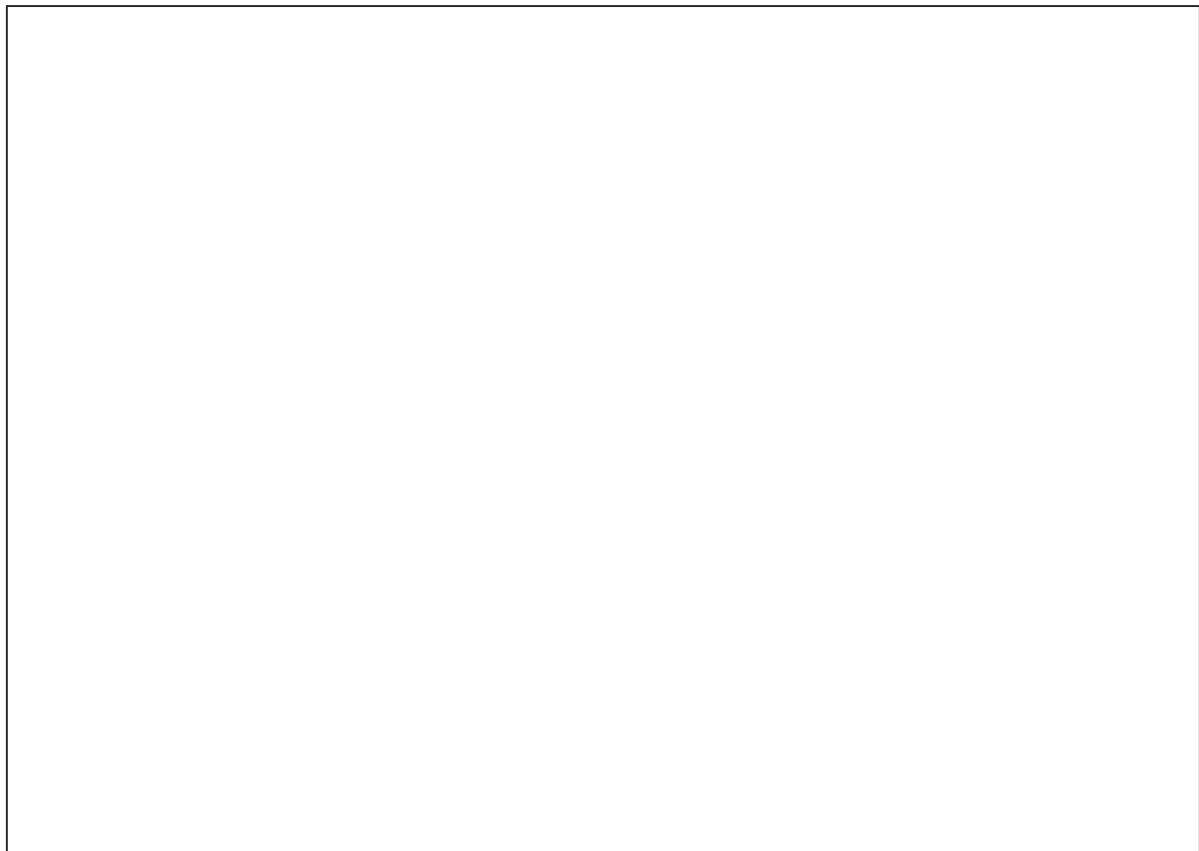


Figure 1: Cycle de développement de *P.falciparum* {White, 2013 #9}

IV. LE GLOBULE ROUGE PARASITE

IV. 1 Ultra structure des stades intra-érythrocytaires.

Comme tout eucaryote, le *Plasmodium* possède plusieurs compartiments intracellulaires: tout d'abord un noyau dont la membrane ne disparaît pas pendant la mitose (cryptogamie). *P. falciparum* possède un réticulum endoplasmique rudimentaire mais la présence d'un véritable appareil de Golgi est encore débattue (16). Outre la mitochondrie, le parasite possède un autre endosymbionte: l'apicoplaste qui contient l'ADN circulaire de 35kb reliquat du génome de l'organisme intégré et très proche de l'ADN chloroplastique.

L'apicoplaste est entouré d'une quadruple membrane lipidique. Le cytoplasme parasitaire est délimité par la membrane plasmique.

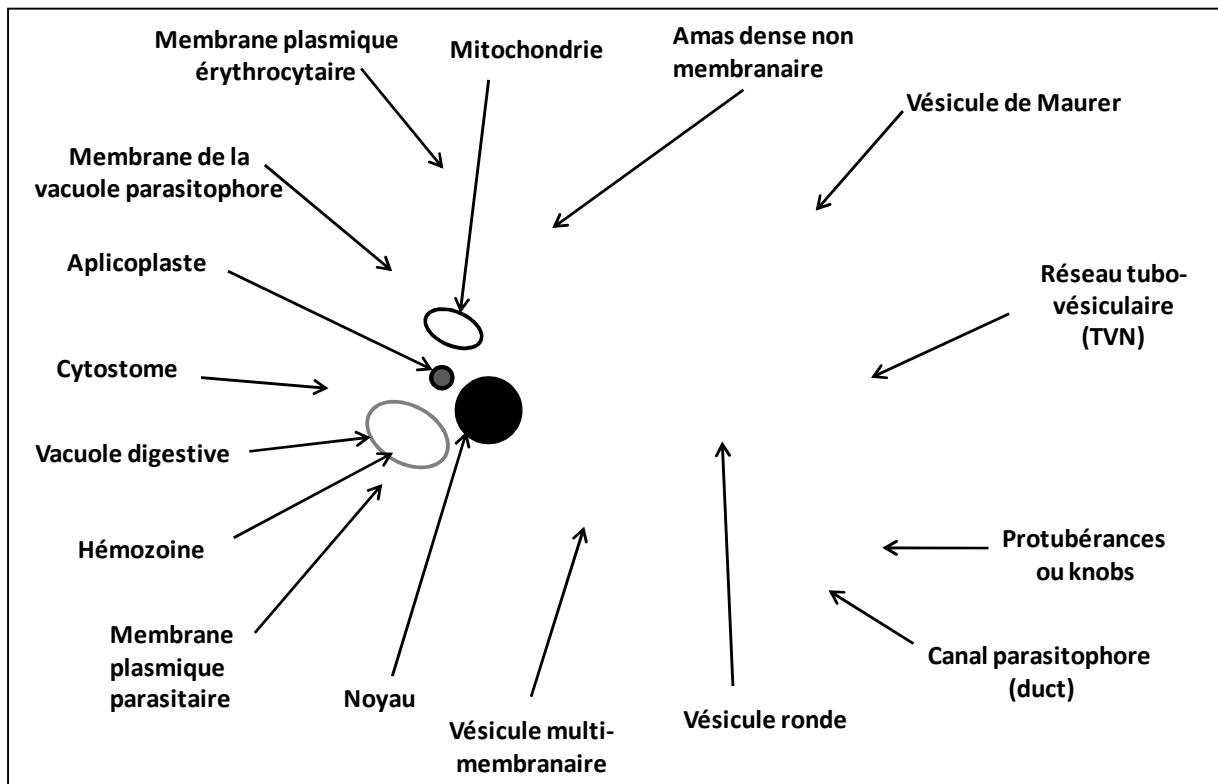


Figure 2 : Représentation schématique de l'érythrocyte parasité (16)

Après l'invasion, le parasite reste dans sa vacuole parasitophore, qui plonge ses ramifications, en réseau de tubules et vésicules, dans le cytoplasme de l'érythrocyte pour former le Réseau Tubo-Vésiculaire (ou TVN). Au point d'initiation de l'invasion pourrait subsister un point de contact entre le TVN et la membrane plasmique de l'érythrocyte, ouvert sur le milieu extérieur et appelé canal parasitophore ou le duct (**Figure 2**).

Il existe aussi un point de contact entre la membrane plasmique parasitaire et la membrane de la vacuole parasitophore, qui s'invaginent, toutes deux, pour former le cytostome, une sorte de vésicule d'endocytose du cytoplasme de l'érythrocyte et qui est dirigé vers la vacuole digestive du parasite. C'est à ce niveau que le contenu du cytoplasme érythrocytaire est dégradé (principalement

l'hémoglobine) et l'hème polymérisé en hémozoïne ou pigment malarique (**Figure 2**).

IV. 2 Antigènes du globule rouge parasité: cas de *PfEMP1*

Les antigènes parasitaires exprimés à la surface des érythrocytes infectés sont essentiels à la survie et aux effets du parasite. Ils appartiennent surtout à des familles de variants qui permettent au parasite d'échapper à la réponse immune (17, 18). Ils sont codés par la famille de multi gène de *P. falciparum* appelée le gène *var* (19, 20).

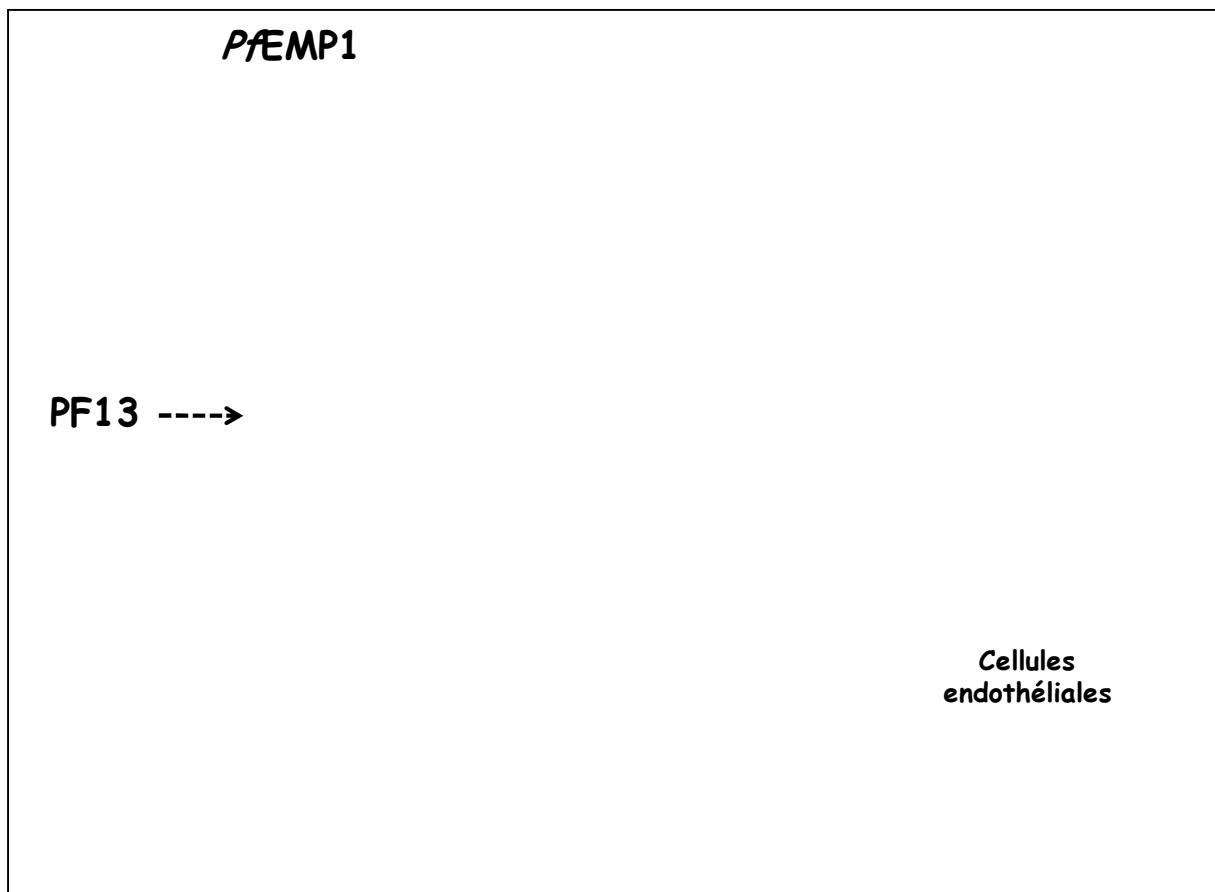


Figure 3: Représentation schématique de l'antigène *PfEMP1*: implication dans la cytoadhérence à l'endothélium et le rosetting (18).

Les produits de ce gène appelés protéine-1 de *P. falciparum* de la membrane d'érythrocyte (ou *PfEMP-1*), sont des polypeptides de 200 à 350 kD

hautement variables (21) et pourvus de plusieurs sites de fixation qui catalysent l'adhésion des érythrocytes parasités à l'endothélium vasculaire (22, 23).

Cette cytoadhérence des parasites dans les petits vaisseaux périphériques les protègerait de la destruction au niveau splénique (**Figure 3**) (18).

Une autre famille multi génique codant pour les antigènes parasitaires à la surface des érythrocytes est la famille des gènes *rifin* (24, 25). Ils auraient un rôle accessoire dans la fixation des érythrocytes non infectés aux érythrocytes infectés ou rosetting (17, 26, 27).

Plusieurs autres molécules de parasite codées dans les érythrocytes infectés présentent un haut degré de diversité antigénique, reflétant l'expression des gènes alléliques ou des gènes alternatifs appartenant aux familles de multi gènes (17, 28).

V. PATHOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE

Les signes cliniques du paludisme sont très divers et vont du simple portage asymptomatique aux manifestations graves telles que le coma, l'anémie sévère, l'insuffisance rénale aiguë ou l'œdème pulmonaire pouvant entraîner la mort. Il existe toute une échelle de symptômes et les critères permettant de classer les accès en accès simple ou grave, semblent varier selon les praticiens. En outre, cette symptomatologie palustre est dépendante de la virulence du parasite, du niveau d'immunité acquis par le malade et de divers facteurs génétiques.

V. 1 L'accès palustre simple

Les symptômes de l'accès simple à *P. falciparum* ne sont pas spécifiques mais doivent être parfaitement connus pour pouvoir évoquer le diagnostic chez un patient. Il s'agit d'une fièvre inconstante, masquée par les antipyrétiques et pouvant être accompagnée de frissons et/ou algies comme les myalgies, les douleurs abdominales avec ou sans diarrhée et vomissement.

En l'absence de diagnostic précoce et surtout d'un traitement antipaludique adéquat, l'évolution peut être observée avec l'apparition de signes dits de gravité (29).

V. 2 Les accès palustres graves

➤ Définition

Le paludisme grave pose de sérieux problèmes de définition et donc de diagnostic clinique lorsque la plupart des symptômes qui lui sont attribués s'additionnent à ceux d'autres pathologies notamment infectieuses. Il regroupe en particulier les formes cliniques du paludisme ayant un risque d'évolution fatale.

En pratique, il ne concerne que le paludisme à *P. falciparum* mais ne se limite pas au neuropaludisme ou accès pernicieux comme cela était considéré jusqu'au début des années 1980 (30). Il est potentiellement mortel chez le sujet non immun. Le décès, quand il survient, est secondaire à la défaillance aiguë d'une ou de plusieurs grandes fonctions (31) et ce parfois même si la mise en place d'un traitement étiologique s'avère efficace (30).

La symptomatologie et la physiopathologie des accès sévères restent encore très complexes et de nombreuses définitions ont été émises en vue d'une meilleure prise en charge des malades. L'OMS a défini le paludisme grave comme la présence de formes asexuées de *P. falciparum* dans le sang, associée à un ou plusieurs critères cliniques ou biologiques (**Tableau I et II**) (30).

Tableau II: Critères cliniques de paludisme grave de l'OMS en 2000 (32)

Critères cliniques	Précisions du texte de l'OMS
Prostration	Extrême faiblesse
Trouble de la conscience	Adulte: score de Glasgow < 9 Enfant: score de Blantyre < 3
Respiration acidosique	Détresse respiratoire chez l'enfant
Convulsions répétées	Au moins 2 par 24heures
Collapsus cardiovasculaire	Pression artérielle systolique < 80 mmHg en présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire
Œdème pulmonaire	Définition radiologique
Saignement anormal	Définition clinique sans autre précision
Ictère	Définition clinique ou bilirubine totale > 50 µmol/L
Hémoglobinurie macroscopique	Uries rouges foncées ou noires, hémoglobinurie ou myoglobinurie à la bandelette, absence d'hématurie microscopique

Tableau II : Critères biologiques de paludisme grave de l'OMS en 2000 (32)

Critères biologiques	Précisions du texte de l'OMS
Anémie sévère	Enfant: hématocrite < 15% ou hémoglobine plasmatique < 5g/dL Adulte: hématocrite < 20% ou hémoglobine plasmatique < 7 g/dL
Hypoglycémie	Glycémie < 2,2 mmol/L (< 400 mg/dL)
Acidose	Bicarbonates < 15 mmol/L ± acidémie avec pH < 7,35
Hyperlactatémie	Lactates plasmatiques > 5 mmol/L
Hyperparasitémie	Parasitémie 4% chez le non immun
Insuffisance rénale	Enfant: diurèse < 12 mL/kg/24 h ou créatininémie > 265 µmol/L (> 3,0 mg/dL) après réhydratation Adulte: Créatininémie > 265 µmol/l avec diurèse < 400 mL/24h après réhydratation

La séquestration des G Rp par *P falciparum* au niveau des capillaires et des veinules post-capillaires a été décrite et trois principaux mécanismes sont actuellement identifiés: la cytoadhérence, le phénomène de «rosetting» et l'autoagglutination (**Figures 3 et 4**).

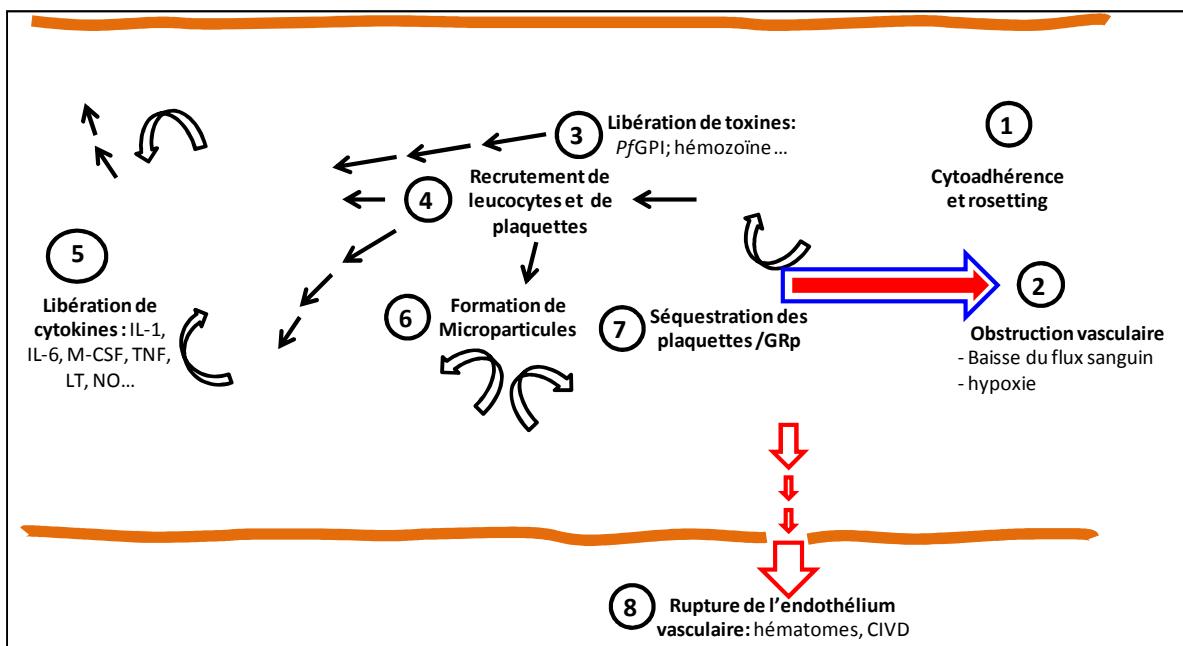


Figure 4: Physiopathologie du paludisme grave

➤ Défaillance neurologique: le neuropaludisme

Encore appelé neuropaludisme ou paludisme cérébral, c'est la forme la plus étudiée. Cliniquement, il peut s'agir d'une simple obnubilation et/ou somnolence et/ou confusion; mais aussi de manifestations plus graves tels que le coma, les convulsions chez les enfants. La profondeur du coma est appréciée par score de Glasgow chez l'adulte ou de Blantyre chez l'enfant (**ANNEXE II**). Lorsque l'infection est contrôlée et correctement traitée, la récupération neurologique est souvent complète, notamment chez l'adulte ou les séquelles sont plus rares que chez l'enfant.

➤ Acidose métabolique

Elle est très fréquente dans le paludisme de réanimation avec le plus souvent une acidose lactique associée à un choc. Plusieurs phénomènes ont été retenus pour expliquer un tel état clinique glycolyse anaérobie, diminution du transport en oxygène liée à l'anémie, dysfonctionnement mitochondriaire (33)

L'acidose métabolique peut aussi être en partie liée à une insuffisance rénale aiguë avec anurie. Cette acidose à travers l'augmentation du taux de lactate semble avoir une bonne valeur pronostique tant en zone d'endémie palustre que lors du paludisme grave d'importation (34).

➤ Atteinte rénale

Elle est plus fréquemment retrouvée chez l'adulte (Figure 5). Il s'agit d'une nécrose tubulaire aiguë plurifactorielle pouvant résulter d'une déshydratation ou d'une hémolyse (35).

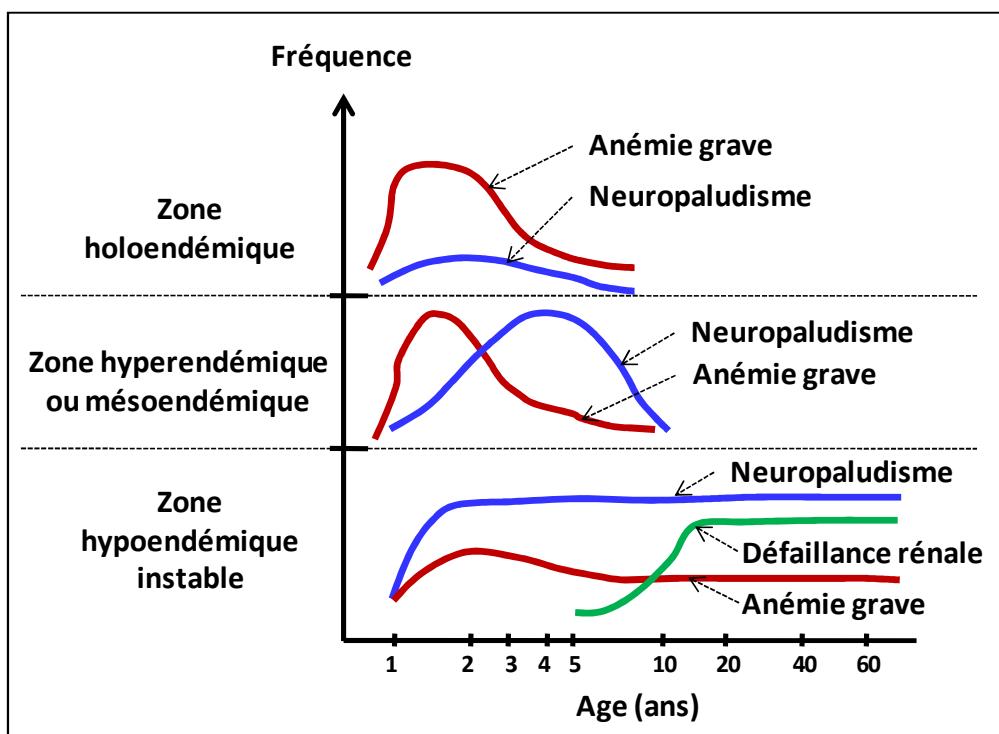


Figure 5: Variations des formes cliniques du paludisme grave suivant l'endémicité palustre et l'âge des patients

➤ Atteintes hématologiques

La thrombopénie est fréquente et souvent profonde dans le paludisme de réanimation. Sa valeur pronostique est faible et les mécanismes physiopathologiques restent imparfaitement connus (36).

L'anémie palustre sévère ou Severe Malaria Anemia (SMA) est la deuxième forme la plus étudiée après le neuropaludisme (Figure 5). Elle est rarement profonde chez l'adulte, avec un taux d'hémoglobinémie compris entre 8 à 9 g/dl à l'admission. Lors que ce taux est ≤ 6 g/dl, il est recommandé de rechercher une hémorragie non extériorisée telle qu'une rupture de rate ou une fièvre bileuse hémoglobinurique (37).

➤ Hyperparasitémie, l'hypoglycémie et ictère

La pertinence de l'ictère et de l'hyperparasitémie ($>4\%$) au cours du paludisme grave est mal connue et très controversée.

Dans une étude antérieure, la médiane de la parasitémie à l'admission chez les patients décédés était de 18,2 % contre 3,5 % chez les survivants. Concernant la bilirubine, la médiane chez les décédés était de 153 mol/L pour 53 mol/L chez les survivants (38). Selon l'OMS, une parasitémie plus de 4 % chez l'adulte non immun, est considérée comme suffisante, même isolément, pour justifier une prise en charge de type forme grave (39). Dans une étude très récente concernant le paludisme grave d'importation de l'adulte, la parasitémie à l'admission en réanimation était un des trois facteurs indépendamment prédictif de la mortalité avec un risque augmenté de 1,4 fois pour chaque accroissement de 5% (40). Par ailleurs, en analyse par classes, le seuil le plus pertinent pour prédire la mortalité était celui de 15 %. La relation entre parasitémie et gravité est variable selon les populations et doit être évaluée en tenant compte du contexte. Ainsi lors d'études réalisées en Asie, le seuil retenu pour définir la gravité était de 10% (41). Dans certaines régions d'Afrique où l'endémie palustre est maximale et stable tout au long de l'année, les porteurs

asymptomatiques sont fréquents et l'hyperparasitémie est souvent définie au seuil de 20% (39, 42).

➤ L'hypoglycémie

Elle est de mauvais pronostic et se définit par un taux sanguin de glucose $< 2,2$ mmol/L ($< 400\text{mg/dL}$) (32). Elle doit être systématiquement recherchée en cas de troubles de la conscience ou de convulsions. Elle relève de plusieurs mécanismes comme une augmentation de la consommation de glucose par le parasite et surtout par l'hôte, une inhibition de la néoglucogenèse sous l'effet du TNF- α et une baisse des réserves de glycogène (43). Chez l'enfant, elle est souvent accompagnée d'une baisse des taux abaissés d'insuline (44-46). Ainsi, l'hyperinsulinémie induit par la quinine, décrit surtout chez la femme enceinte, aurait rarement une traduction clinique chez l'enfant, même en présence d'une malnutrition (47).

VI. IMMUNITE ANTI-PALUSTRE

VI. 1 Notion de prémunition

Les études épidémiologiques de **Koch** sur le paludisme à Java, à la fin du 19^{ème} siècle, furent les premières à montrer que c'était essentiellement les enfants qui souffraient d'accès cliniques et qu'il apparaissait avec les années une « activité » permettant de réduire et même de bloquer l'invasion parasitaire. Ces observations furent confirmées dans de nombreuses autres zones d'endémie, concluant à une installation progressive chez l'homme d'un état de tolérance se traduisant par des modifications de sa susceptibilité parasitologique et clinique, en fonction de l'âge (48). Cependant, cette immunité n'est pas stérile rendant compte du fait que les individus acquièrent la capacité de juguler la multiplication des parasites (49). En 1924, **Sargent** propose le terme de « prémunition » pour définir cet état particulier de résistance traduisant l'existence

d'une réponse immune protectrice, caractérisée par l'absence de signes cliniques, en présence du parasite (50).

La caractéristique majeure de cette prémunition est qu'elle est lente à s'établir et que son maintien nécessite la présence d'une infection latente. L'absence d'infection pendant au moins six mois suffit pour la perdre (51). Elle est spécifique de l'espèce et des souches parasitaires circulant dans la zone où elle a été acquise. Elle est aussi dépendante du niveau d'endémicité palustre et ne peut être définie que dans un contexte épidémiologique bien précis (52).

VI. 2 Immunité innée

Il s'agit de mécanismes cellulaires et humoraux non spécifiques du parasite et ils sont partiellement connus. Des études récentes dans des systèmes non parasitaires ont permis de démontrer qu'une famille de protéines codées par la lignée germinale: les TLRs (Toll Like Receptors), serait importante pour la défense innée de l'hôte (53). Ce sont des récepteurs appartenant au groupe des PRR et présents surtout à la surface des cellules de l'immunité innée et reconnaissant des ligands exprimés à la surface des pathogènes. Chez les mammifères, l'activation des macrophages par l'intermédiaire de ces TLRs entraîne l'induction de gènes effecteurs qui contrôlent et initient les défenses immunitaires innées contre un grand nombre de pathogènes (13). Bien qu'il n'y ait pas encore, à ce jour, de recherches considérables sur le rôle des TLRs dans les infections parasitaires, il est probable que ce système soit d'égale importance dans la défense innée contre *P falciparum* avec le système classique initialement décrit.

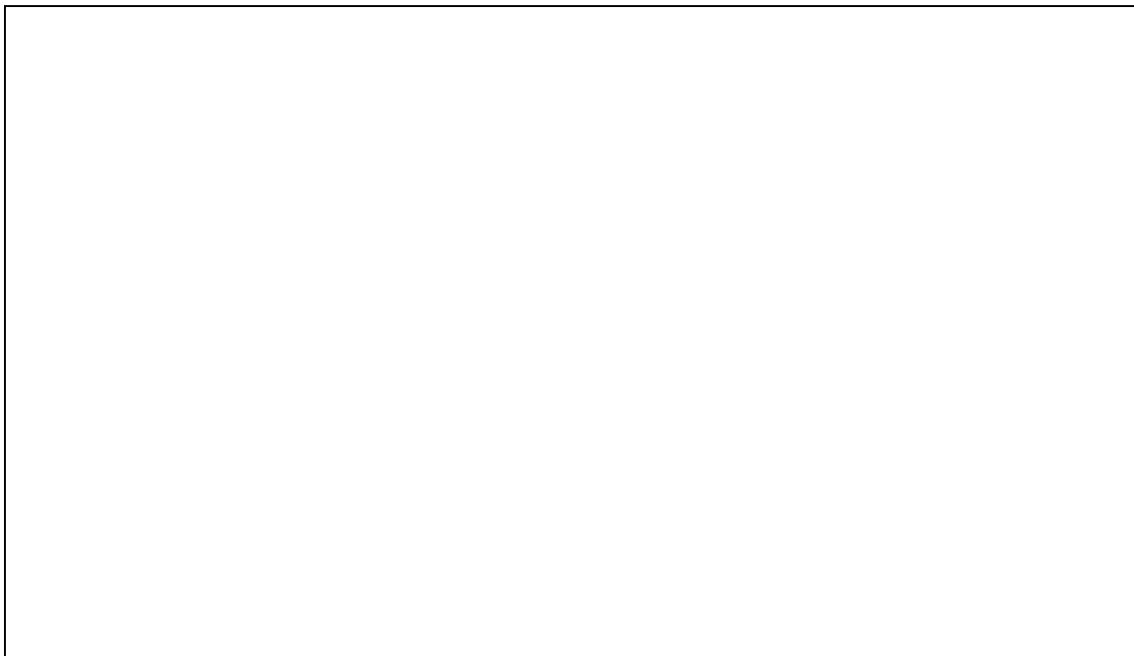


Figure 6: Rôle des cellules effectrices et des cytokines dans l'immunité anti-*Plasmodium* (54)

Toutefois, les neutrophiles, les phagocytes, les mononucléées et les cellules « tueuses naturelles » ou NK, jouent un rôle prépondérant dans les défenses innées observées au cours des infections palustres. Les cellules NK augmentent particulièrement en nombre et sont capables de détruire *in vitro* les globules rouges parasités par *P. falciparum* (55, 56). En outre, une étude antérieure a montré que les cellules NK localisées au niveau hépatique sont capables de détruire les hépatocytes parasités par des sporozoïtes (57)

Ces lymphocytes NK sont aussi de puissantes cellules productrices de cytokines telles que l'IFN- γ (Figure 6). Ce qui leurs confère une activité parasiticide importante. L'IFN- γ augmente la potentialité des cellules NK et des macrophages à détruire les globules parasités (58, 59).

VI. 3 Immunité acquise

Chez les populations vivant dans des régions où le paludisme est endémique, l'infection palustre induit de fortes réponses immunitaires humorales avec une prédominance d'IgM et d'IgG (IgG₁ et IgG₃). Bien qu'une grande proportion de ces immunoglobulines ne soit pas spécifique au paludisme,

réflétant une activation polyclonale de la lignée lymphocytaire B, plus de 5% d'entre elles sont des Ac spécifiques pouvant réagir avec une grande variété d'Ag parasitaires.

Le transfert passif des IgG de donneurs immuns a montré que les Ac pouvaient conférer une protection contre le paludisme (55, 60). Ces Ac réduisent la parasitémie et les manifestations cliniques de la maladie. Ces études antérieures rapportaient aussi certains Ag importants induisant ces réponses protectrices et surtout retrouvés chez différentes souches de *P. falciparum* (61).

VI. 3. 1 Les cellules B et les anticorps

L'infection palustre engendre la production par les lymphocytes B de concentrations plasmatiques très élevées d'immunoglobulines (62). Il s'agit d'immunoglobulines spécifiques et d'Ac polyclonaux. Bien que les Ac de différents isotypes puissent avoir des fonctions protectrices, les IgG sont à cet effet, les plus performantes. Chez les sujets prémunis, les Ac cytophiles IgG₁ et IgG₃ sont prédominants (63). En effet, les amplitudes des réponses en IgG₁ et IgG₃ sont plus élevées chez les sujets dont les anticorps sont aussi les plus efficaces dans la neutralisation des parasites *in vitro* (64). Des taux significativement élevés d'IgG₃ dans certaines populations sont parfois associés à des épisodes cliniques (65, 66). Toutefois, les concentrations élevées d'IgG₂ seraient aussi associées à une diminution du risque d'infection par *P. falciparum*. Cela a été observé chez certains individus dont les monocytes portent un variant allélique du récepteur RFcIIA des IgG. Ce récepteur a la capacité de fixer l'IgG₂ une sous classe d'immunoglobuline normalement non cytophylique (67).

Les Ac peuvent protéger du paludisme par plusieurs de mécanismes. En effet, ils peuvent inhiber l'invasion des érythrocytes par les merozoïtes ou bloquer la croissance intra-érythrocytaire du parasite (68). Une augmentation de l'élimination des érythrocytes parasités de la circulation est aussi médiaée par les

Ac se fixant à la surface de ces hématies. Par cette action, les immunoglobulines préviennent ainsi la séquestration des GRp dans les petits vaisseaux et favorisent leur élimination au niveau de la rate (69, 70). L'opsonisation des GRp augmente significativement leur phagocytose, la cytotoxicité et leur inhibition par diverses cellules effectrices telles que les neutrophiles et les monocytes/macrophages (63, 71). L'interaction entre les érythrocytes opsonisés et les cellules effectrices induit la libération de facteurs, comme le TNF- α toxique pour les parasites mais pouvant aussi causer des lésions tissulaires (72).

VI. 3. 2 Les cellules T

Parmi les sous populations des lymphocytes T, les cellules T CD4 $^{+}$ sont essentielles à la protection immune contre les stades asexués sanguins du parasite. Leurs fonctions régulatrices et leurs actions effectrices ont été établies, aussi bien dans le paludisme expérimental que dans celui de l'homme (Figure 6). Pour le paludisme expérimental, la preuve d'une protection à la suite d'un transfert adoptif de cellules T et de l'augmentation de la susceptibilité à l'infection de souris ayant subi une déplétion en cellules T CD4 $^{+}$, ont été rapportées (73) (74).

Ces cellules répondent aux antigènes de *P. falciparum* *in vitro* en proliférant et/ou en produisant des cytokines telles l'IFN- γ ou l'IL-4 (73, 75).

Néanmoins, la stimulation *in vitro* des cellules T CD4 $^{+}$ de sujets exposés peut aboutir à la production d'IL-4 en concordance avec les concentrations sériques d'Ac spécifiques dirigés contre les antigènes utilisés pour la stimulation lymphocytaire (76, 77). En outre, une augmentation de la production d'IFN- γ et une prolifération cellulaire ont été notées avec des cellules de sujets guéris d'un accès palustre (78).

Pour les cellules T CD8 $^{+}$, elles jouent un rôle important dans l'immunité contre les stades pré-érythrocytaires (79) et contribuent à la protection contre le paludisme sévère (75, 80). Leur implication est moins claire ; il a été rapporté

que ces cellules interviennent par une cytotoxicité via les molécules HLA de classe I (75). Les hématies n'exprimant pas de molécules du CMH, la lyse des érythrocytes parasités par les cellules T CD8⁺ cytotoxiques, n'aurait pas un rôle dans la défense contre ses stades sanguins du parasite (54).

VII. HYPOTHESE ET STRATEGIE D'APPROCHE DU TRAVAIL

Le paradoxe du paludisme est qu'il reste un fléau sanitaire planétaire alors qu'il est l'une des pathologies infectieuses les plus simples à la fois à prévenir, à diagnostiquer et à traiter en phase non compliquée bien qu'il n'existe pas encore de vaccin. Malgré un arsenal thérapeutique efficace, il est difficile de réduire en dessous de 15 à 20% la létalité moyenne des accès graves et leur prise en charge reste encore difficile en milieu hospitalier. Ces accès sévères résulteraient d'une cascade complexe d'événements incluant probablement un défaut quantitatif et/ou qualitatif des réponses en Ac protecteurs surtout dirigées contre les stades sanguins du parasite.

Dans le cadre d'une approche analytique du paludisme hospitalier, nous avons choisi de travailler sur stade de globule rouge parasité (GRp) notamment certaines cibles d'intérêt de *P falciparum*, retrouvées à sa surface. L'implication des GRp dans l'immuno-pathogenèse des accès cliniques sévères à *P falciparum* a été largement rapportée dans la littérature particulièrement par les phénomènes de cytoadhérence et de rosetting. Ces derniers mécanismes seraient reliés aux protubérances ou knobs présents à la surface des GRp et renfermant plusieurs antigènes dont certains étudiés dans le cadre de ce travail. Notre étude a pour objectif de fournir des données sur les déterminants immunologiques anti-GRp impliqués dans la pathogenèse des manifestations graves du paludisme. Une des questions de base est : dans le cadre du paludisme de réanimation confirmé est ce que la létalité peut être rapprochée d'une réponse en IgG déficiente contre les protéines R23, GST-5, RESA, *Pf*EB200 ou PF13 des GRp par *P falciparum*.

Cette analyse est basée sur l'hypothèse que le recrutement de malades hospitalisés, malgré son hétérogénéité individuelle, est bien cadré et que tous les individus ont les mêmes chances de se rétablir du fait d'un suivi médico-clinique dans un service de réanimation de haute qualité. Une issue fatale peut-être considérée comme liée au malade et donc à son état immuno-parasitologique à l'entrée car tout a été mis en œuvre pour permettre un rétablissement du patient.

I. SITE ET CADRE D'ETUDE

I. 1. Site d'étude: Dakar et sa banlieue

I. 1.1- Caractères géo-climatiques

La région de Dakar s'étend sur une superficie de 550 km², soit 0,28% du territoire national. Située dans la presqu'île du Cap-Vert, elle est comprise entre les 17°10 et 17°32 de longitude Ouest et les 14°53 et 14°35 de latitude Nord.

Son climat est caractérisé par une longue saison sèche qui s'étale entre Octobre - Juin et une saison pluvieuse de Juillet à Septembre. La température moyenne y varie entre 20 et 30°C. La végétation naturelle a pratiquement disparu et la ville n'abrite ni cours d'eau ni collections d'eau naturelles permanentes en dehors de quelques bassins de rétention de l'eau des pluies. Ces points d'eau constituent des gîtes larvaires potentiels pour les anophèles (81).

I. 1.2- Endémicité palustre

La transmission du paludisme débute en Août et se prolonge jusqu'en Décembre, surtout du fait de l'existence de collections d'eau permanentes. Le niveau de transmission reste cependant très faible, au maximum une piqûre infestante par personne et par an en bordure immédiate des marais (82). La population vectorielle est constituée d'anophèles du complexe *A. gambiae s.l.* et surtout de l'espèce *A. arabiensis* qui y sévit toute l'année (83). Les Culicinés sont aussi rencontrés, comme dans d'autres centres urbains avec une large prédominance de *C. quinquefasciatus* (82).

La zone est considérée comme hypoendémique. L'indice plasmodique varie entre 2 et 7%, selon les saisons et les quartiers (84) et le paludisme serait responsable d'environ 12,4% de l'ensemble de la pathologie fébrile (85). La résistance aux antipaludiques, notamment à la chloroquine est aussi notée et a été l'objet de plusieurs études; dont certaines ont rapporté plus de 40% de résistance (84).

I.2 Cadre d'étude: Service de réanimation de l'HPD - l'Unité d'Immunogénétique IPD

Les patients étudiés dans ce travail ont été recrutés au niveau de l'hôpital Principal de Dakar : le service de Réanimation pour les cas de paludisme sévère et les services de médecine pour les accès non compliqués.

Le paludisme grave constitue une bonne partie des hospitalisations annuelles du service de réanimation. C'est sur la base d'une large expérience de prise en charge retrouvée dans ce service et reconnue comme référence par toutes les autres structures hospitalières de la sous-région, que nous avons choisi de collaborer avec les réanimateurs de l'HPD dans le cadre de ce travail. Ce choix est également nécessaire devant la complexité physiopathologique, la variabilité clinique et surtout les multiples facteurs confondants des formes palustres aggravées ; toute étude y ayant trait doit définir de façon claire et reproductible les cas cliniques à recruter (variabilité des données cliniques en fonctions des cliniciens) ainsi que le protocole de surveillance clinico-biologique et thérapeutique. Les services de soins intensifs de l'HPD répondent parfaitement à ces critères.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériels de laboratoire

- Hotte à flux laminaire vertical.....(Flufrance[®], France)
- Plaques Maxisorp[®](Nunc[®] Danemark)
- Plaques Immulon[®](Dynatech, Roskilde[®] Danemark)
- Pipettes: 20, 200, 1000µl.....(Gilson Medical Electronics S.A., France)
- Pipettes Falcon 5ml, 10ml(Becton Dickinson S.A, USA)
- Pipettes multicanaux de 12 à volume ajustable.....(Costar[®] Cambribge, USA)
- Bac de dilution.....(Mega[®])
- Autoclave(Lequeur[®])

- Balance de précision(Navigator®)
- Spectrophotomètre(Biorad®)
- Centrifugeuse(Jouan® GR412)
- Etuves à 37°C(Napco® 6001)
- Microscope optique.....(Leica® DMBL)
- Congélateur à -20°C(Goldstar®)
- Réfrigérateur à 4°C(White-Westinghouse®)
- Tubes avec EDTA(Becton Dickinson S.A, Vacutainer)
- Tubes d'échantillonnage 1,8ml(Nunc® Danemark)
- Tubes coniques Falcon 15; 50 ml(Becton Dickinson S.A.)

II. 2 Tampons et réactifs chimiques

- Tampon de “ coating ”: PBS1X

Dissoudre une pastille de PBS (Sigma®) dans 100ml d'eau distillée.

- Tampon de lavage: PBS+0,01% de Tween 20 avec pour un litre

H₂O distillée.....1000 ml

PBS pastille.....10 pastilles

Tween 20 (Merck®).....1 ml

- Tampon de saturation et de dilution des sérum et conjugués: PBS BSA 1%

Tween 1% de pour un litre

H₂O distillée.....100 ml

PBS pastille.....1 pastille

BSA (Sigma®).....1 g

Tween 20.....100 ml

- Réactif de révélation:

TMB (3,3'5,5' Tétraméthylbenzidine + H₂O₂)(Eurobio®)

TMB peroxidase substrate et Peroxidase substrate solution B

Les deux solutions A et B sont mélangées extemporanément à volume égale

- La solution d'arrêt:

Pour un volume final de 580 ml:

Acide ortho-phosphorique H₃PO₄ (Sigma[®]).....20 ml

H₂O distillée.....560 ml

- Anticorps conjugués:

Anti-human IgG peroxydase conjugate (Cappel[®], USA)

Anti-human IgM peroxydase conjugate (Cappel[®], USA)

II. 3 Sérum témoins

Ce sont des sérum préalablement testés contre les antigènes étudiés ou les extraits totaux de *P falciparum*.

- **Sérum contrôles négatifs** sont au nombre de deux:

- Le témoin **NA** ou « Naïf Africain » élaboré à partir de sérum d'individus vivant à Dakar et n'ayant pas une expérience récente ou ancienne d'accès palustres, connue.
- Le contrôle **SAB** ou Sérum AB, il s'agit d'un sérum d'humain du groupe sanguin AB connu comme négatif pour les Ac antiparasitaires.

- **Sérum contrôles positifs** sont également de deux types:

- Le témoin **SHI** ou Sérum Hyper-immun: constitués de plasma prélevés au cours d'enquêtes immuno-épidémiologiques transversales, entreprises chez les populations des villages endémiques de Ndiop et de Dielmo. Ces villages sont situés à environ 280 Km au Sud-Est de Dakar et la transmission palustre y est pérenne avec environ 4,6 à 79 piqûres infectantes par personne et par an respectivement Ndiop et Dielmo. Les individus prélevés ont développé une prémunition (86).

- Le témoin positif **MH** ou Sérum «Marcel Hommel», il s'agit d'un pool de sérum recueillis chez des africains prémunis vivant dans une zone de forte endémicité palustre. Sa concentration en Ac totaux est estimée à 20 mg/ml et on y retrouve essentiellement des IgG dirigées contre *P falciparum*.

II. 4 Sérum étudiés (population d'étude)

Les prélèvements étudiés ont été réalisés sur quatre années. La collecte a lieu entre le mois d'Août et le mois de Décembre en 2003, en 2004 et en 2005. Entre Novembre 2012 et Janvier 2013, de nouveaux échantillons ont été collectés.

Sur l'ensemble des patients colligés, seuls 251 patients ont été sélectionnés pour l'étude. Il s'agit de 110 individus consultant pour un accès palustre simple et de 141 patients hospitalisés pour un accès palustre grave. Dans ce dernier groupe, on enregistre 38 patients avec paludisme sévère et ayant une issue fatale. La sélection des patients étudiés a reposé sur les antécédents, l'historique de la maladie et surtout les éventuelles pathologies infectieuses associées au paludisme et susceptibles d'interférer sur les dosages effectués.

Pour chaque patient une prise de sang a été faite sur un tube contenant de l'EDTA et la confection d'une goutte épaisse ou d'un frottis sanguin mince un TDR au moment du recrutement a permis la recherche de parasite ou d'Ag et l'appréciation de la densité parasitaire. Le sang a été ensuite séparé en deux parties dont l'une a servi à l'étude des données hématologiques (NFS par automate). La deuxième fraction centrifugée à 2000 tours/mn pendant 10 mn, a permis d'isolement du plasma et son stockage à -20°C. Ces plasmas ont été dilués à 1/100 au moment des dosages d'anticorps.

II. 5- Les antigènes étudiés

Cinq antigènes recombinants ont été étudiés. Ils sont associés à la surface du globule rouge parasité: R23, GST-5, PfEB200, RESA et PF13. Les trois premières protéines ont été exprimées à partir du vecteur *E. coli* et fusionnées à la glutathion-S-transférase ou GST de *Schistosoma* pour leur purification.

L'analyse des réponses Ac contre ces trois Ag requiert donc un contrôle des réponses Ac individuelles contre la GST.

- II. 5. 1 La protéine R23

C'est un Ag recombinant constitué de 11 répétitions de 6 acides aminés. Il est codé par des séquences nucléotidiques situées au niveau du chromosome 3 de *P. falciparum*. Il correspond à une partie d'un gène R45 constitué de répétitions (**Figure 7**). Ce gène R45 code au stade de trophozoïte pour une protéine de 160 kDa dont la partie centrale est formée de 90 répétitions des six acides aminés (HKSDS N/S/H) constituant les séquences de l'Ag R23 (**87**).



Figure 7 : Représentation schématique du gène R45

La protéine R23 est retrouvée au niveau de la membrane des GRp. C'est un candidat vaccin qui induit une protection chez le modèle primate: *Saimiri*, seul ou en association avec d'autres Ag (**88**). En effet, elle constitue une cible des mécanismes de clairance parasitaire par l'induction d'Ac capables de médier une phagocytose *in vitro* (**89**). Selon certains auteurs, cette protéine R23 interagit avec des Ac humains pour inhiber la croissance parasitaire par le mécanisme de l'ADCI (**63**).

Nous avons utilisé une protéine R23 préparée par génie génétique avec le vecteur d'expression pGEXA. Sa purification est faite par chromatographie d'affinité en fusion avec la GST de *Schistosoma*.

II. 5. 2 La protéine GST-5 ou *PfEMP3/Clone 5*

Il constitue le produit d'un clone isolé d'une banque d'expressions génomiques de la souche Palo Alto FUP/SP. C'est la partie C terminale de *PfEMP3* localisé au niveau des "knobs". L'antigène GST-5 est constitué de 24 répétitions de 13 acides aminés et 2 répétitions de 15 acides aminés; ces motifs répétitifs sont très riches en asparagine (90).

Il est aussi la cible d'Ac dirigés contre un variant parasitaire ou variant "R", majoritaire qui émerge à la suite d'une pression immune *in vivo*, par les Ac dirigés contre la souche d'origine ("O") (91).

II. 5. 3 La protéine *PfEB200*

Cette molécule recombinante est formée d'une séquence de 135 acides aminés de l'antigène *Pf332*. Le gène de *Pf332* a été localisé dans les régions télomériques et sub-télomériques du chromosome 11 de *P. falciparum*. Il code pour une protéine de 2,5 mégadaltons qui se trouve dans le cytoplasme des GRp lors de la phase tardive du développement parasitaire. Cette protéine sera ensuite transportée au niveau de la membrane dans des structures vésiculaires.

PfEB200 est formé de nombreuses répétitions "dégénérées" dont la séquence consensus est de type : XXXEEXXEXXX où X est généralement un acide aminé hydrophobique (92).

Le *PfEB200* est la cible d'Ac capables d'inhiber la ré-invasion parasitaire et d'interférer avec la cytoadhérence des parasites. Il a été montré protecteur chez le modèle *Saïmiri* et semble aussi intervenir dans les tests de phagocytose immune *in vitro* (93).

II. 5. 4 La protéine RESA

La protéine RESA encore connue sous le nom de *Pf155*, est une protéine de 155 kDa codée par un gène du chromosome 1 parasitaire (94). Il renferme deux blocs de séquences répétitives. Entre ces régions répétées; il existe un segment de 70 résidus d'amino-acides. L'Ag RESA est synthétisé par les

parasites matures, au sein desquels il est stocké dans des granules denses (95). A la suite de l'invasion, il est libéré dans le cytosol de la cellule hôte, où il est phosphorylé (96) et reste associé à la membrane de la cellule nouvellement envahie. C'est un Ag détectable dans les érythrocytes infectés jusqu'à environ 18 à 24 heures après l'invasion (97).

II. 5. 5 L'antigène PF13

Encore appelé PF13-0003 ou PF13-DBL1 α 1, il s'agit d'un antigène nouvellement identifié à la surface des GRp. Il est localisé dans le segment DBL1 α 1 de l'Ag *PfEMP1* qui serait fortement impliquée dans le phénomène physiopathologique du rosetting. Nous avons utilisé l'antigène recombinant PF13 produit avec le vecteur d'expression *E. coli* et purifié par SDS-PAGE (98).

II. 6 Méthodes

II. 6. 1 Technique ELISA

Le dosage des immunoglobulines dirigées contre les différents antigènes étudiés est fait par la technique **ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (**Figure 8**).

➤ **Principe**

C'est une technique de dosage immunoenzymatique qui repose sur l'utilisation d'antigènes ou d'anticorps fixés sur une phase solide (généralement une plaque en plastique) et permettant de capter l'Ac ou l'Ag de la solution étudiée. L'addition d'immunoglobulines hétérologues conjuguées à une enzyme permet la transformation d'un substrat chromogène en produit coloré dont l'intensité, mesurée en densité optique (DO), est proportionnelle à la quantité d'anticorps fixés.

➤ **Mode opératoire**

- ❖ La méthode **ELISA** comporte différentes étapes et pour chacune d'elles certaines conditions doivent être respectées:

❖ Sensibilisation des puits de plaque avec l'antigène (Coating)

Les plaques sont sensibilisées avec 100µl par puits d'antigènes préalablement dilués dans du tampon de dilution. Ces plaques sont ensuite incubées à 4°C pendant une nuit. La dilution effectuée est variable selon l'antigène et elle est déterminée par une calibration.

❖ Saturation des plaques

- Laver les plaques 3 fois avec le tampon de lavage et sécher en tapant contre un papier absorbant;
- Distribuer 130 µl de la solution de blocage dans tous les puits;
- Incuber pendant 1 heure, les plaques à 37°C.

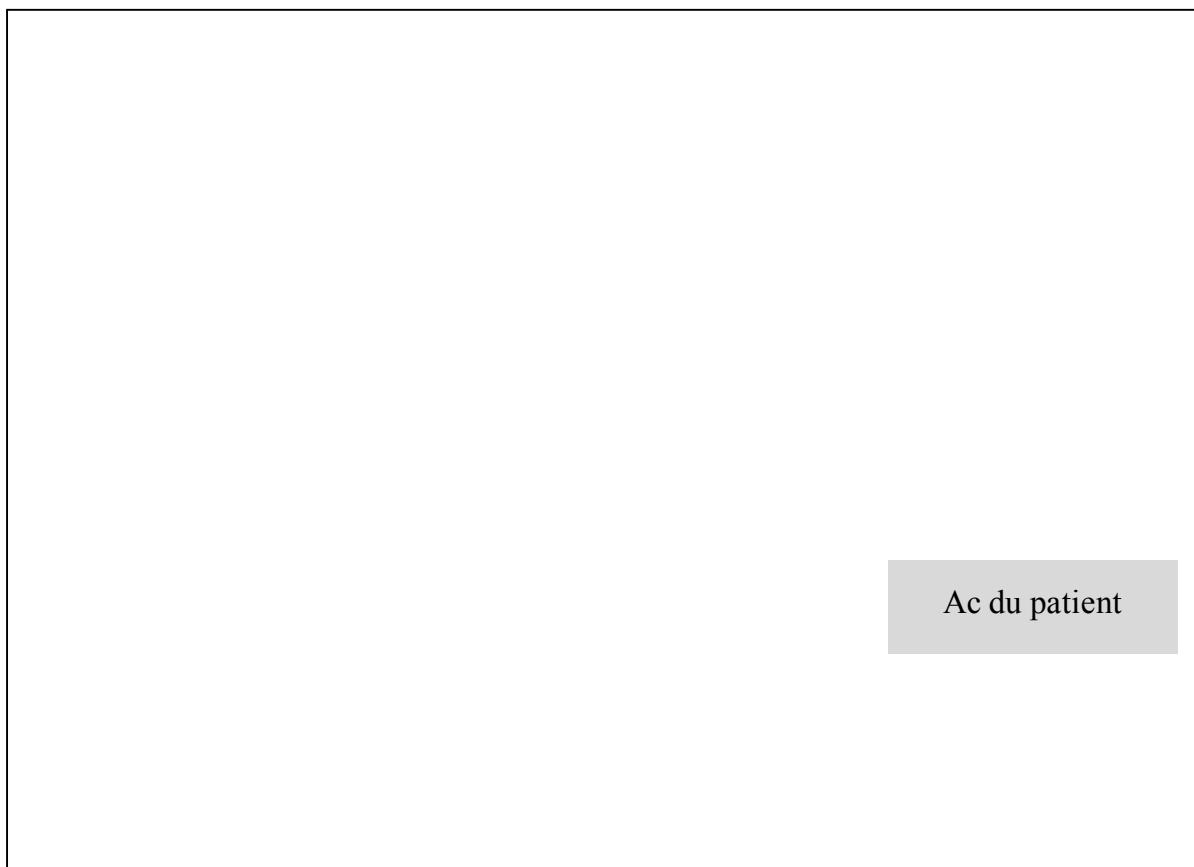


Figure 8: Principales étapes du dosage d'anticorps par ELISA

❖ Addition des premiers anticorps

- Laver 3 fois les plaques avec le tampon de lavage et sécher;

- Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérum témoins positifs et négatifs et les plasmas de volontaires au 1/100 dans le tampon de dilution;
- Distribuer 100 μ l des sérum et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque;
- Incuber pendant 1heure les plaques à 37°C.

❖ Addition du second anticorps ou conjugué

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et sécher;
- Distribuer dans les puits 100 μ l du conjugué anti-IgG humaine de chèvre diluée à 1/5000 dans le tampon de dilution;

Incuber pendant 1heure la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.

❖ Addition de substrat (TMB)

- Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien sécher.
- Distribuer 100 μ l de substrat dans chaque puits.
- Incuber pendant 5 à 10 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en ajoutant 100 μ l d'une solution acide orto phosphorique H₂SO₄ 1M dans chaque puits.

❖ Lecture et expression des résultats

Mesurer les densités optiques (DO) des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm en utilisant le logiciel LECTEUR ELISA.

Calculer des ratios de DO à l'aide de feuilles Excel: matrice de calcul

II. 6. 2 Analyses statistiques

Les tests non paramétriques de Mann Whitney, de Wilcoxon et de Spearman ont été utilisés pour la comparaison statistique des séries de résultats. Ils ont été calculés avec le logiciel STATVIEW 5.1 et une différence est considérée comme significative pour une probabilité $p < 0,05$.

III. RESULTATS

III. 1 Caractéristiques de la population d'étude

III. 1. 1 Données générales de la population d'étude

Sur un total de 285 patients initialement recrutés seuls 251 ont été sélectionnés pour la présente étude. L'exclusion de 34 patients a été motivée par la présence des pathologies infectieuses associées au paludisme et pouvant interférer sur nos dosages effectués, ou le constat d'une grossesse.

Tableau III: Données générales de la population d'étude

Caractéristiques	Accès sévères			Accès simples
	Survivants	Décédés	Global	
Effectifs (N)	103	38	141	110
Sexe M/F	68/35	20/18	88/53	60/50
Age moyen (ans)	33,5 (11 – 80)	29,2 (1 – 77)	30,4 (8 – 80)	28,7 (1 – 77)
Délai d'admission ou consultation (j)	4 (1 - 12)	6 (2 - 21)	5 (1 - 21)	3 (2 - 10)
Traitemen t antérieur (%)	71,5	57,9	67,8	49,3

Le **tableau III** résume les données générales de la population d'étude.

Notre cohorte est composée de 110 personnes souffrant d'un accès palustre simple et de 141 patients hospitalisés pour un paludisme sévère parmi lesquels 38 patients sont décédés. Le sex-ratio est en faveur des hommes dans les différents groupes. Un âge moyen de 28 à 34 ans est observé dans les groupes d'accès. Pour délai d'admission, il s'agit du nombre de jour entre la première apparition des signes cliniques et la date d'hospitalisation ou de consultation. Ce

délai s'avère court dans les accès simples (3 jours); alors que dans le paludisme de réanimation, on note une moyenne de 5 jours. Toutefois, il est plus long chez les patients décédés d'un accès sévère (6 jours). S'agissant du traitement antipaludique reçu par les patients avant leur recrutement, nous avons noté des taux plus faible dans le paludisme simple (49,3%). Pour le paludisme de réanimation on observe globalement un taux de (67,8%).

III. 1. 2 Caractéristiques clinico-biologiques de la population d'étude

Les caractéristiques clinico-biologiques de la population d'étude sont résumées au niveau du **Tableau IV**. L'analyse des données montre des variations statistiquement significatives pour la parasitémie et la glycémie. En effet, les patients hospitalisés pour paludisme grave ont des taux plus élevés pour ces deux paramètres. En outre toujours dans une comparaison de ces caractéristiques clinico-biologiques suivant la gravité, les taux de plaquettes et de l'hématocrite sanguins sont plus forts chez les patients consultant pour un accès palustre simple ($P < 0,05$).

Tableau IV Caractéristiques clinico biologiques de la population d'étude

Caractéristiques	Accès sévères					Accès simples
	Survivants	<i>P*</i>	Décédés	Global	<i>P*</i>	
Effectif (N)	103		38	141		110
Densité parasitaire (%)	2,5 (0,01 - 16)	<0,02	4,2 (0,01 - 11)	2,9 (0,01 - 16)	<0,002	1,8 (0,01 - 6)
Plaquettes (G/μl)	138,0 (11,0 - 980,0)	ns	107,8 (3,1 - 467,0)	139,9 (3,1 - 980,0)	0,01	199 (25- 512)
Hémoglobine (g/dl)	10,8 (2,1 - 36,6)	<0,01	9,5 (5,7 - 13,4)	10,4 (2,1-36,6)	ns	11,3 (4,1- 16,3)
Hématies (10^6 / μl)	3,9 (0,65 - 6,54)	ns	4,4 (2,2 - 7,4)	4,1(0,650- 7,4)	ns	4,6 (2,3- 7,6)
Leucocytes (10^3 / μl)	9,8 (3,0 - 32,9)	<0,01	15,4 (2,4 - 87,0)	11,3(2,4 - 87,0)	ns	10,3 (4,5- 31,0)
Hématocrite (%)	31,9 (10,5-46,1)	ns	28,5 (16,9-40,0)	31,1(10,5 - 46,1)	<0,01	35,964(23,9 - 49,0)
Glycémie à jeun (g/l)	1,35 (0,36 - 3,26)	ns	1,08 (0,15 - 3,79)	1,28 (0,10- 3,79)	<0,01	1,03 (0,45 - 2,50)
pH sanguin	7,4 (7,01-7,5)	<0,01	7,3(6,7-7,5)	7,35 (6,7-7,54)	-	-
Bicarbonate	22,16 (4,8-92,2)	<0,01	16,56 (3,3-29,6)	20,6 (3,3-92,2)	-	-
Bilirubine totale (mg/L)	36,44 (2,0-145,0)	<0,01	55,03 (5,0-240,0)	41,28 (2,0-241,0)	-	-
Score de Glasgow	11,12 (6 - 15)	<0,01	9,371 (4,00 -15,0)	10,659 (4,000-15,0)	-	-

P = Test de comparaison de Mann Withney, ns = non significative.*

Dans le paludisme sévère, une comparaison statistique des données suivant l'issue des patients a permis de retrouver des variations significatives entre le groupe des patients décédés et celui des survivants. Il s'agit des taux de leucocytes sanguins, de la densité parasitaire et des bicarbonates qui sont plus élevés chez les patients guéris tandis que le taux sanguin d'hémoglobine, le pH sanguin et le score de Glasgow (utilisé pour une appréciation de la profondeur du coma) sont plus faibles chez les malades n'ayant pas survécu aux accès sévères à *P falciparum* (**Tableau IV**).

III. 2- Evolution des réponses IgG contre les antigènes étudiés

III. 2. 1- Variations des réponses IgG suivant la gravité des accès palustres

III. 2. 1. 1 Comparaison des prévalences de répondeurs suivant la gravité palustre

Les répondeurs étant considérés comme les individus ayant des ratios de DO ≥ 2 , nous avons déterminé leurs prévalences dans chaque groupe de patients. Les résultats sont résumés au niveau du **Tableau V**.

Tableau V: Prévalences de répondeurs dans les différents groupes de patients

Caractéristiques	Accès sévères					Accès simples
	Survivants	P*	Décédés	Global	P*	
IgG anti-R23	13%	ns	11%	13%	ns	20%
IgG anti-<i>Pf</i>EB200	73%	< 0,05	52%	68%	ns	69%
IgG anti-GST5	62%	< 0,05	44%	58%	< 0,05	50%
IgG anti-RESA	21%	ns	22%	21%	ns	24%
IgG anti-PF13	59%	< 0,05	45%	55%	< 0,05	64%
IgG anti-GST	13%	< 0,05	3%	7%	ns	3%

P* = Test de comparaison de Mann Withney, ns = non significative.

Globalement, l'analyse montre des pourcentages de répondeurs en IgG supérieurs à 50% pour *PfEB200*, GST-5 et PF13. L'antigène PF13 est bien reconnu et cette reconnaissance avoisine parfois les taux de 50 à 60%, enregistrés avec la protéine *PfEB200*.

En comparant les prévalences suivant la gravité des accès palustres (paludisme simple *versus* paludisme sévères), seules les proportions des réponses IgG à ratio de DO ≥ 2 et dirigées contre PF13 ou l'Ag GST5 sont discriminantes entre les accès non aggravés et les cas de paludismes sévères. En effet, il y a significativement plus de répondeurs contre la protéine PF13 chez les patients atteints d'accès simple que chez ceux hospitalisés pour un paludisme compliqué ($P= 0,036$). Un résultat contraire est observé pour les réponses en IgG anti-GST-5 ($P= 0,040$).

Pour les deux autres Ag des GRp étudiés (RESA et R23), nous avons retrouvé des prévalences inférieures à 30% (**Tableau V**).

Les réponses Ac dirigées contre la GST, un Ag non parasitaire couplé au peptide *PfEB200*, R23 ou GST5 au moment de sa purification, sont très faibles en termes de prévalences de répondeurs ($\leq 15\%$) et d'intensités des réponses. Cependant, c'est un antigène plus reconnu par les décédés même si ses pourcentages de répondeurs ne dépassent pas les 13%. Ces faibles réponses obtenues contre la GST isolée et ayant été retranchées dans celles du complexe GST5/GST ou *PfEB200/GST* consolident les résultats obtenus avec des antigènes couplés à la GST.

III. 2. 1. 2 Comparaison des taux d'anticorps suivant la gravité

Les niveaux de réponses en IgG dirigées contre les différents antigènes du GRp testés sont exprimés en ratio de DO et illustrés au niveau de la **Figure 9**, suivant la gravité de l'accès palustre.

Les amplitudes de réponses en IgG anti-GRp sont significativement plus faibles dans le paludisme sévère que dans les accès palustres non aggravés.

Concernant les taux d'IgG anti-R23, anti-GST-5, anti-*Pf*EB200 et anti-RESA aucune variation importante n'est observée entre les deux types d'accès palustres. Seule la comparaison des réponses en IgG dirigées contre le candidat vaccin PF13 a permis de déceler une baisse significative des niveaux de réponses chez les patients ayant des accès simples comparés au groupe des malades avec accès sévères ($P < 0,01$).

Figure 9 : Comparaison suivant la gravité des accès palustres des niveaux réponses en IgG anti-antigènes de globules rouges parasités

III. 2. 2 Evolution des réponses IgG suivant l'issue dans le paludisme de réanimation

Concernant les variations des prévalences de répondeurs contre les Ag étudiés suivant l'issue du paludisme de réanimation, le **tableau V** précédemment décrit, résume les résultats obtenus. Pour les trois Ag: *Pf*EB200, GST-5 et PF13, les prévalences de répondeurs sont particulièrement plus faibles dans le groupe des patients décédés du paludisme de réanimation ($P < 0,05$). Pour toutes les autres réponses Ac de type IgG aucune variation statistiquement significative n'a été notée quel que soit l'Ag considéré (**Tableau V**).

Figure 10 : Comparaison des niveaux réponses IgG anti-antigènes de globules parasités suivant l'issue dans le paludisme grave.

Les histogrammes de la **figure 10** représentent une comparaison des amplitudes de réponses en IgG dirigées contre les protéines de la surface des globules rouges parasités étudiées dans les cas de paludisme de réanimation avec une séparation en patients décédés et en patients survivants.

De manière globale, la figure permet de constater une hausse non négligeable des taux d'IgG dirigées contre les Ag de GRp chez les patients survivants comparés au groupe des malades à issue fatale. Pour certains Ag, on note l'absence de variation significative des réponses en IgG suivant l'issue de l'accès grave.

Les amplitudes de réponse IgG anti-antigènes de globules rouges parasités sont plus élevés chez les patients ayant survécu au paludisme de réanimation avec des p-values respectives de 0,005, 0,013 et 0,028.

III. 2. 3 Variation des IgG suivant les caractéristiques hémato parasitologiques des patients

III. 2.3.1 Comparaison suivant les densités parasitaires dans les deux types d'accès palustres

Sur la base du seuil parasitémique de 4% considéré par l'OMS comme étant la limite au delà de laquelle on parle de gravité de l'infection par *P falciparum* (**Tableau II**), nous avons réparti notre population d'étude particulièrement les cas de paludisme sévère, en deux groupes: (i) des patients ayant une parasitémie inférieure à 4% et (ii) des patients avec une parasitémie \geq 4%.

Figure 11: Variations des taux d'anticorps suivant la parasitémie dans le paludisme sévère: (a) groupe des patients survivant et (b) groupe des patients décédés

La comparaison des réponses en IgG dirigées contre les antigènes étudiés est illustrée par les figures 10 a (pour les survivants) et b (pour les patients décédés).

Le résultat discriminant concerne l'antigène RESA qui, chez les patients survivant, est plus reconnu par ceux à faibles parasitémie mais avec une variation non significative du point de vue statistique (**Figure 11**). Pour ce même antigène, les malades décédés fortement parasités (parasitémie $\geq 4\%$) montrent les réponses en IgG les plus élevées ($P = 0,021$).

Dans les accès palustres non aggravés, la distribution des patients en deux groupes selon le seuil de 4% de parasitémie n'a pas permis de détecter une variation importante des taux d'Ac.

III. 2. 3. 2 Comparaison suivant les taux d'Hb dans le paludisme de réanimation

Afin de rechercher les liaisons entre les réponses IgG et les défaillances hématologiques telles que l'anémie, nous avons déterminé dans chaque groupe d'accès palustres, deux nouveaux sous-groupes de patients suivant le taux d'hémoglobine séparés au seuil de 11g/dL.

La séparation de notre population d'étude selon le taux d'hémoglobine a permis la comparaison des réponses IgG dirigées contre les antigènes étudiés, dans les accès graves comme chez les patients atteints de paludisme simple (**Figures 12 a et b**).

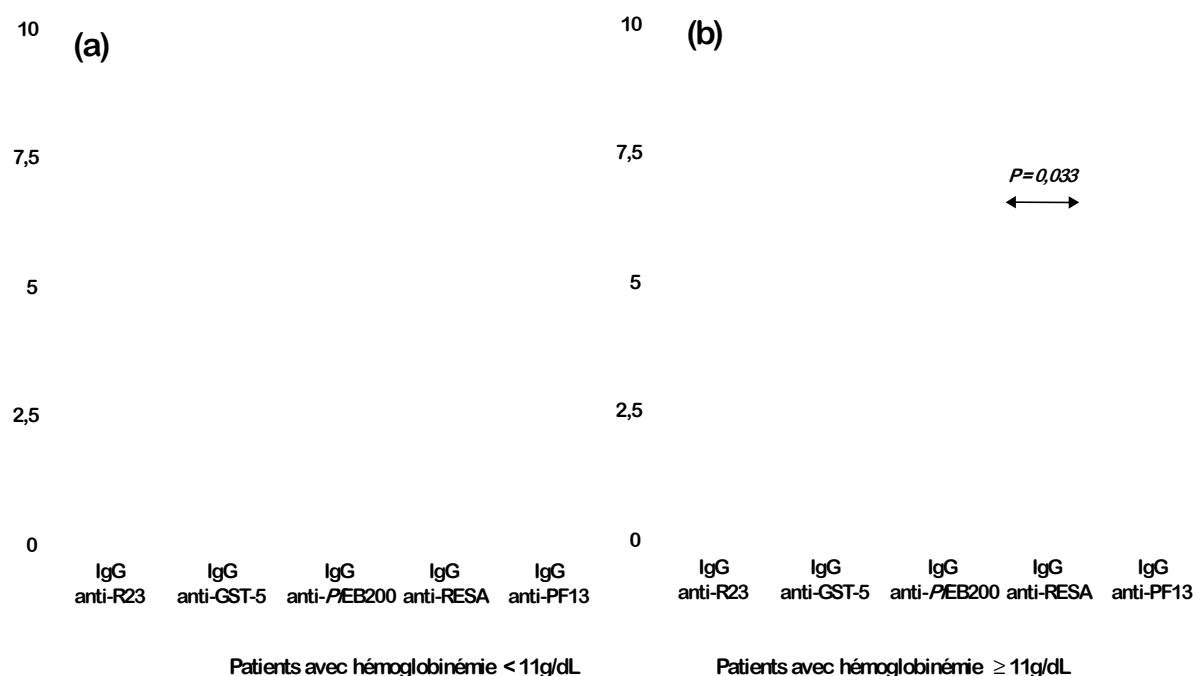


Figure 12: Variations des taux d'anticorps suivant le taux d'hémoglobine: (a) groupe des patients avec paludisme grave et (b) groupe des patients avec paludisme simple

- Dans le groupe des patients hospitalisés pour un accès palustre grave, les amplitudes de réponses en IgG ne sont pas différentes suivant les taux d'hémoglobine inférieurs ou supérieurs à 11g/dL, ceci pour tous les antigènes

testés (**Figure 12a**). Aussi, dans ce même groupe de patients avec un paludisme de réanimation, une analyse plus poussée tenant compte du taux d'hémoglobine et comparant les réponses Ac entre les survivants et les décédés, n'a pas montré de différence caractéristique des taux d'IgG suivant l'issue des malades.

- Chez les patients atteints de paludisme non compliqué, la réponse en IgG anti-RESA apparaît discriminante entre les deux sous-groupes de définis suivant l'hémoglobinémie. Les variations observées avec les autres antigènes étudiés ne sont pas significatives du point de vue statistique (**Figure 12b**).

III. 3 Interrelations entre les réponses anticorps dans les deux types d'accès

Certains des Ag testés provenant de la même protéine mère ou de protéines très proches à la surface des GRp, nous avons jugé opportun d'explorer les éventuelles relations entre les réponses Ac dirigées contre eux, dans les accès simples (Tableau VI) comme dans le paludisme grave (Tableau VII). Pour effectuer ce type d'analyse, nous avons recherché les corrélats entre les réponses IgG et évalué l'influence de la réponse propre à chaque protéine dans les amplitudes d'IgG contre une autre protéine étudiée.

Dans le paludisme simple ou grave de recrutement hospitalier, nous avons remarqué l'existence d'une très forte corrélation positive entre les amplitudes des réponses IgG anti-*Pf*EB200 et celle dirigée l'antigène R23. Les deux antigènes montrent des coefficients de corrélation supérieurs à 90%.

Dans le paludisme non aggravé, les réponses IgG anti-RESA sont corrélées à celles dirigées contre R23, *Pf*EB200 et GST-5 (Rho = 40%). Les réponses en IgG anti-GST-5 sont aussi faiblement corrélées à celles des IgG anti-*Pf*EB200 (Rho < 0,5) chez les accès graves.

Dans le paludisme simple, les réponses en IgG anti-PF13 donnent des tendances de corrélations positives avec les réponses Ac dirigées contre tous les antigènes testés (R23, GST-5 et *Pf*EB200) à l'exception des IgG anti RESA (**Tableau VI**). Par contre dans le paludisme de réanimation, seules les réponses

IgG anti-RESA apparaissent corrélées faiblement à celle dirigées contre l'antigène PF13 (**Tableau VII**).

Tableau VI: Interrelations entre les réponses en IgG contre les antigènes testés dans le paludisme simple

	R23	GST-5	PfEB200	RESA
GST-5	$Rho = 0,94$ $P = 0,125$			
PfEB200	$Rho = 0,99$ $P < 0,001$	$Rho = 0,29$ $P = 0,127$		
RESA	$Rho = 0,40$ $P = 0,009$	$Rho = 0,42$ $P < 0,001$	$Rho = 0,40$ $P = 0,010$	
Pf13	$Rho = 0,42$ $P = 0,019$	$Rho = 0,37$ $P = 0,013$	$Rho = 0,41$ $P = 0,021$	$Rho = 0,16$ $P = 0,234$

Tableau VII: Interrelations entre les réponses en IgG contre les antigènes testés dans le paludisme sévère

	R23	GST-5	PfEB200	RESA
GST-5	$Rho = 0,44$ $P < 0,001$			
PfEB200	$Rho = 0,94$ $P < 0,001$	$Rho = 0,37$ $P < 0,001$		
RESA	$Rho = 0,42$ $P < 0,001$	$Rho = 0,41$ $P < 0,001$	$Rho = 0,39$ $P < 0,001$	
Pf13	$Rho = 0,15$ $P = 0,991$	$Rho = 0,02$ $P = 0,039$	$Rho = 0,14$ $P = 0,542$	$Rho = 0,24$ $P = 0,012$

IV- DISCUSSION

Ce travail, basé sur l'analyse des réponses Ac contre des Ag parasites associés à la membrane des l'hématies infectées à savoir GST-5, R23, RESA, *PfEB200* et *PF13*, a permis la recherche de marqueurs immunologiques de gravité dans le paludisme de recrutement hospitalier, en zone urbaine. Il s'agit d'une étude réalisée chez des patients hospitalisés pour un accès palustre sévère confirmé ou consultant pour un paludisme simple. Notre objectif principal a été de rechercher une éventuelle variation des réponses Ac pouvant souligner l'intérêt pronostique de l'une ou des cibles choisies. La connaissance de telles cibles constituerait une avancée dans la maîtrise des mécanismes physiopathologiques.

Après les contraintes méthodologiques et les caractéristiques clinico-biologiques des patients, nous discuterons des apports de l'étude dans la compréhension de l'immunité antipalustre en milieu hospitalier notamment des données relatives à l'évaluation des réponses IgG dirigées contre des Ag parasites des GRp d'une part et d'autre part des avantages du choix des Ag du GRp cibles d'Ac potentiellement protecteurs contre la gravité et l'issue des accès.

➤ Méthodologie

Sur le plan méthodologique, il convient de souligner le choix des critères cliniques et biologiques de définition des cas de paludisme sévère à *P falciparum* utilisés par l'OMS (99) et améliorés par **Saissy et al.** (100). En effet, devant la complexité clinique et physiopathologique du paludisme particulièrement des accès graves, toute étude permettant l'identification de facteurs de sévérité ou la recherche de marqueurs pronostiques, doit obligatoirement reposer sur une définition claire des cas cliniques. Telle que rapporté par **Basse** (101), le choix de cette base de recrutement des patients en milieu hospitalier est renforcé par le fait qu'elle soit aisément applicable par les réanimateurs. Notre étude a nécessité une collaboration quotidienne entre

cliniciens, biologistes et chercheurs pour parvenir au recrutement d'une population d'étude rigoureusement ciblée et représentative. Les données cliniques et les résultats des divers tests de diagnostic prescrits par les médecins traitant ont été recueillis sur formulaire (**ANNEXE I**). La confirmation de l'infection par *P. falciparum* a reposé sur la recherche du parasite par frottis ou goutte épaisse ou d'antigènes plasmodiaux au niveau sanguin par un test de diagnostic rapide.

Cette stratégie d'approche a été facilité par l'accessibilité géographique de l'HPD ainsi que par l'existence depuis 1991, d'une collaboration entre l'Unité d'Immunogénétique de l'IPD et divers services de l'HPD particulièrement ceux des Départements de la Réanimation et la Fédération des Laboratoires.

S'agissant de la technique ELISA ayant servi au dosage des Ac, sa reproductibilité est confirmée par le fait que nos résultats soient comparables à l'ensemble des données antérieurement obtenues avec les mêmes antigènes et contrôles positifs ou négatifs. Ces comparaisons sont facilitées par l'expression en ratio de DO par rapport à un sérum négatif connu. Cette procédure reposant sur les données précédemment rapportées par notre Unité (**102-104**), constitue un outil analytique pour pouvoir mener des comparaisons entre différentes séries de mesures et entre les divers groupes.

Aussi avec cette approche, nous avons pu valider l'utilisation des Ag GST-5, R23 et *PfEB200* sur la base de ratio de DO retranché des bruits de fond reliés à la protéine GST: Ag de *Schistosoma* utilisé au moment de la purification.

➤ Caractères clinico-biologiques

Concernant les caractéristiques clinico-biologiques des patients étudiés, nous avons retrouvé des variations significatives de la parasitémie suivant la gravité. En effet, les densités parasitaires observées sont plus élevées dans le

paludisme sévère. Il s'agit d'un constat rarement rapporté dans les études antérieures en raison de l'hypothèse de séquestration parasitaire dans des organes comme le cerveau en cas de neuropaludisme (105). Ce résultat pourrait être lié au seuil de 4% de parasitémie, choisi par l'OMS pour définir les cas sévères (32, 100). Les thrombopénies sont plus fréquentes dans le paludisme grave; ils constituent un marqueur biologique de sévérité de l'infection à *P. falciparum* très largement rapporté (106) en raison surtout du rôle joué par les plaquettes dans la pathogénèse du paludisme. La thrombopénie est probablement liée à l'activation des plaquettes via l'interaction entre le *PfEMP1* parasitaire et la molécule CD36 de la surface plaquettaire. Les plaquettes activées peuvent former des micro-agrégats avec GRp et obstruer les vaisseaux sanguins (20).

Le taux d'hémoglobine et de bicarbonates sanguins, le pH et les concentrations sériques de bilirubine totale sont plus faibles dans les accès graves mortels et apparaissent à nouveau comme des marqueurs à valeur pronostique (107-109). L'hyperleucocytose décrite chez les patients décédés constitue l'un des résultats non moins importants de notre étude et des observations similaires ont été récemment publiées dans une étude thaïlandaise qui ne rapporte pas de variations des taux d'hémoglobine et de plaquettes suivant l'issue du paludisme de réanimation (110). Les mécanismes immuno-pathologiques sur lesquels reposent ces variations biologiques ne sont pas directement imputables au parasite notamment à sa forte présence au niveau du sang. Ainsi, nous avons retrouvé des parasitémies plus faibles chez les patients ayant survécu aux accès graves, mais aucune corrélation n'a été mise en évidence entre ces densités parasitaires et le taux d'un quelconque paramètre biologique. Ce dernier résultat est contraire à celui des travaux de **Moulin et al.** ayant rapporté une association entre les taux plaquettes et les parasitémies dans le paludisme compliqué de l'enfant (111). La variabilité de la symptomatologie palustre suivant l'endémicité, l'influence de l'âge des patients sur l'évolution de

la maladie, les similitudes entre le paludisme et certaines maladies infectieuses ou non infectieuses, la possibilité d'une association avec d'autres pathologies pouvant être bénignes ou malignes demeurent un ensemble de facteurs pouvant expliquer la discordance entre nos résultats provenant surtout de patients adultes et ceux de **Moulin et al.**

➤ Les caractéristiques des réponses immunes anti-GRp

Elles sont relatives aux apports de cette étude pour mieux cerner les déterminants de la réponse immunitaire dans le cadre du paludisme sévère afin de dégager une cible du GRp importante pour la protection.

Le rôle des hématies infectées dans les mécanismes physiopathologiques du paludisme a été très largement démontré dans des études antérieures (70, 112, 113). Ces travaux justifient entre autres que le GRp soit une cible critique dans les mécanismes de protection contre l'infection à *P. falciparum*. Dans une étude réalisée en Gambie, **Marsh et al.** ont démontré que les Ac dirigés contre les Ag de surface des GRp étaient associés à la protection (113). Cette découverte est consolidée par l'utilisation de la réactivité des Ac contre les GRp dans les tests de fonctionnalité des immunoglobulines anti-*P. falciparum* (114).

Les facteurs exacts du point de vue fonctionnel restent à élucider et les candidats vaccins associés la surface érythrocytaire sont multiples et variés (6). Nous avons étudié divers antigènes connus comme étant: (i) des candidats vaccins très avancés comme la protéine RESA (6) ou (ii) des molécules parasitaires impliquées dans la pathogénie des infections palustres expérimentales ou humaines et contre lesquels des Ac protecteurs ont été rapportés tels que GST-5, R23 et *Pf*EB200 (102) ou (iii) un nouveau antigène appelé PF13 appartenant à la famille *Pf*EMP1 et présent au niveau des knobs (98).

Nos résultats ont montré de faibles prévalences des réponses IgG contre les antigènes R23 et RESA (< 50%). Pour la protéine R23, les données sont

similaires à celles antérieurement décrites en milieu urbain par **Mbengue et al.** (104).

Pour *Pf*EB200, GST5 et PF13, les prévalences de répondeurs sont élevées avec des variations significatives suivant la gravité de l'infection palustre pour seulement les deux derniers antigènes. Concernant la protéine PF13, nos résultats orientent vers les travaux antérieurs de **Carlson et al.** (112) et de **Treutiger et al** (70) ayant rapporté pour les Ac anti-rosettes des prévalences de 88% dans le paludisme non compliqué de l'enfant contre 22% seulement dans les accès sévères. La protéine *Pf*EMP1 étant impliquée dans les phénomènes de rosetting via son fragment DBL α 1 (PF13) il a été démontré que les anticorps anti-DBL α 1 seraient inhibiteurs du phénomène de rosetting (anticorps anti-rosetting) (112, 115). Notre étude décèle une variation des niveaux d'Ac anti-PF13 dans le paludisme hospitalier de l'adulte suivant la gravité d'une part et d'autre part suivant l'issue des accès sévères. L'absence de corrélation entre l'âge et les réponses en IgG anti-PF13 facilite la comparaison de nos données à celles des études de Mackintosh et al. ayant recherché des Ac anti-rosettes chez des enfants kenya (116).

Suivant les densités parasitaires scindées au seuil de 4%, nous avons retrouvé des réponses en IgG anti-PF13 significativement plus faibles chez les patients décédés fortement parasités, un tel fait reposera sur le lien entre la biomasse des GRp séquestrés au niveau cérébrale et l'issue fatale (117).

La protéine RESA, faiblement reconnue par rapport à l'Ag PF13 induit une réponse Ac plus importante chez les patients survivants ayant des parasitémies inférieures à 4%. Dans des études de stimulation *in vitro* utilisant l'*Pf*155/RESA, **Troye-Blomberg et al.** ont démontré que cette protéine induisait une production d'IL-4 associée à une synthèse d'IgG qui réduisent fortement les parasitémies circulantes (78). La différence des niveaux d'IgG anti-RESA suivant la parasitémie chez les patients décédés du paludisme de réanimation pourrait être liée à cette hyperproduction de cytokines (118).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a été réalisé avec une population d'étude comprenant des patients atteints de paludisme «simple» ou de paludisme grave. Nous avons étudié les niveaux de réponses Ac dirigées contre des antigènes exprimés à la surface des GRp par *P. falciparum*. Il s'agit d'antigènes candidat vaccin comme RESA, ou d'antigènes impliqués dans les mécanismes physiopathologiques du paludisme GST-5, R23 et *PfEB200* et d'un nouvel antigène appelé PF13 et les résultats obtenus ont été analysés suivant la gravité des accès, l'issue du paludisme sévère, les taux d'hémoglobine et les densités parasitaires, dans l'optique de rechercher des marqueurs de sévérité ou du pronostic des malades.

Les Ag des GRp par *P. falciparum* comme PF13 sont des cibles fortement reconnues dans le cas du paludisme de réanimation avec des variations suivant la gravité.

Dans les cas mortels, nous avons pu mettre en évidence les déficits de réponses IgG contre PF13 un antigène appartenant à la famille *PfEMP1* largement décrit comme étant à l'origine des phénomènes physiopathologiques de cytoadhérence et de rosetting.

Toutefois, l'évaluation de la fonctionnalité des Ac anti-rosettes par l'étude de la capacité des sérum à induire une phagocytose ou une reconnaissance des GRp pourraient compléter ce type de travail.

Ces travaux devront être poursuivis en parallèle avec les investigations portant sur la génétique du parasite et de l'hôte et seront menés aussi bien chez les cas graves (selon l'issue) que chez les patients atteints d'accès palustre simple en vue d'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la survenue des manifestations graves du paludisme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS. World Malaria Report 2011. 2011:1-246.
2. Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, et al. Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *JAMA*. 2010 Feb 17;303(7):638-47.
3. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet*. 2004 Mar 27;363(9414):1017-24.
4. Petrognani R, Peytel E, Ponchel C, Carpentier JP, Saissy JM. [Severe imported malaria in adults]. *Med Mal Infect*. 2006 Oct;36(10):492-8.
5. Patarroyo G, Franco L, Amador R, Murillo LA, Rocha CL, Rojas M, et al. Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf66 vaccine in children aged 1-14 years. *Vaccine*. 1992;10(3):175-8.
6. Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar J*. 2012;11:11.
7. Schwartz KR, Vinci R. Imported pediatric malaria presenting to an urban pediatric emergency department: a case series. *Pediatr Emerg Care*. 2012 Dec;28(12):1385-8.
8. Perez Lopez J, Negron J, Soltero E, Oms R, Magraner M, Bredy R. Preoperative clinical and demographic characteristis in Puerto Rico patients referred to inpatient cardiac rehabilitation after cardiac surgery. *Bol Asoc Med P R*. 2011 Apr-Jun;103(2):6-13.
9. Omstedt PT, von der Decken A. Functional instability of skeletal muscle ribosomes after protein restriction of rats. *J Nutr*. 1974 Aug;104(8):1061-8.
10. PNLP. Rapport Statistiques PNLP-2009. Juillet 2011:1-87.
11. PNLP. Situation de la prise en charge du paludisme au Sénégal et perspectives. Ministère de la Santé Publique, Rep Sénégal. 2003:72.
12. Boudin C, Robert V, Verhave JP, Carnevale P, Ambroise-Thomas P. *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* epidemiology in a West African village. *Bull World Health Organ*. 1991;69(2):199-205.
13. Chua CL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P. Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol*. 2013 Jan;29(1):26-34.
14. Peters RA, Davis CJ. Discriminating signal from noise: recognition of a movement-based animal display by artificial neural networks. *Behav Processes*. 2006 Mar;72(1):52-64.
15. Francophone UMV. Parasitologie du Plasmodium. 2012.
16. BISCHOFF, E., Puludisme. 06 JUIN 2013.
17. Newbold CI. Antigenic variation in *Plasmodium falciparum*: mechanisms and consequences. *Curr Opin Microbiol*. 1999 Aug;2(4):420-5.
18. Pasternak ND, Dzikowski R. PfEMP1: an antigen that plays a key role in the pathogenicity and immune evasion of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jul;41(7):1463-6.
19. Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, et al. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell*. 1995 Jul 14;82(1):77-87.
20. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, et al. The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell*. 1995 Jul 14;82(1):89-100.
21. Howard RJ, Barnwell JW, Rock EP, Neequaye J, Ofori-Adjei D, Maloy WL, et al. Two approximately 300 kilodalton *Plasmodium falciparum* proteins at the surface membrane of infected erythrocytes. *Mol Biochem Parasitol*. 1988 Jan 15;27(2-3):207-23.
22. Magowan C, Wollish W, Anderson L, Leech J. Cytoadherence by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is correlated with the expression of a family of variable proteins on infected erythrocytes. *J Exp Med*. 1988 Oct 1;168(4):1307-20.

23. Biggs BA, Anders RF, Dillon HE, Davern KM, Martin M, Petersen C, et al. Adherence of infected erythrocytes to venular endothelium selects for antigenic variants of *Plasmodium falciparum*. *J Immunol*. 1992 Sep 15;149(6):2047-54.
24. Kyes SA, Rowe JA, Kriek N, Newbold CI. Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9333-8.
25. Cheng Q, Cloonan N, Fischer K, Thompson J, Waine G, Lanzer M, et al. stevor and rif are *Plasmodium falciparum* multicopy gene families which potentially encode variant antigens. *Mol Biochem Parasitol*. 1998 Nov 30;97(1-2):161-76.
26. Perlmann P, Bjorkman A. Malaria research: host-parasite interactions and new developments in chemotherapy, immunology and vaccinology. *Curr Opin Infect Dis*. 2000 Oct;13(5):431-43.
27. Fernandez V, Hommel M, Chen Q, Hagblom P, Wahlgren M. Small, clonally variant antigens expressed on the surface of the *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte are encoded by the rif gene family and are the target of human immune responses. *J Exp Med*. 1999 Nov 15;190(10):1393-404.
28. Chen Q, Schlichtherle M, Wahlgren M. Molecular aspects of severe malaria. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Jul;13(3):439-50.
29. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S. Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol*. 2011 Oct;27(10):442-9.
30. Imbert P, Gerardin P, Rogier C, Ka AS, Jouvencel P, Brousse V, et al. Severe *falciparum* malaria in children: a comparative study of 1990 and 2000 WHO criteria for clinical presentation, prognosis and intensive care in Dakar, Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002 May-Jun;96(3):278-81.
31. Maitland K, Marsh K. Pathophysiology of severe malaria in children. *Acta Trop*. 2004 Apr;90(2):131-40.
32. WHO. Severe falciparum malaria. World Health Organization. 2000(Communicable Diseases Cluster).
33. van Hensbroek MB, Onyiorah E, Jaffar S, Schneider G, Palmer A, Frenkel J, et al. A trial of artemether or quinine in children with cerebral malaria. *N Engl J Med*. 1996 Jul 11;335(2):69-75.
34. Day NP, Phu NH, Mai NT, Chau TT, Loc PP, Chuong LV, et al. The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria. *Crit Care Med*. 2000 Jun;28(6):1833-40.
35. Bradley J, Coffey P, Arrossi S, Agurto I, Bingham A, Dzuba I, et al. Women's perspectives on cervical screening and treatment in developing countries: experiences with new technologies and service delivery strategies. *Women Health*. 2006;43(3):103-21.
36. White GC, 2nd. Seventeen years' experience with Autoplex/Autoplex T: evaluation of inpatients with severe haemophilia A and factor VIII inhibitors at a major haemophilia centre. *Haemophilia*. 2000 Sep;6(5):508-12.
37. Bruneel F, Gachot B, Wolff M, Bedos JP, Regnier B, Danis M, et al. [Blackwater fever]. *Presse Med*. 2002 Sep 7;31(28):1329-34.
38. Bruneel F, Hocqueloux L, Alberti C, Wolff M, Chevret S, Bedos JP, et al. The clinical spectrum of severe imported *falciparum* malaria in the intensive care unit: report of 188 cases in adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Mar 1;167(5):684-9.
39. Bar-Zeev N, White N. Evidence behind the WHO guidelines: Hospital Care for Children: efficacy and safety of artemisinin derivatives in children with malaria. *J Trop Pediatr*. 2006 Apr;52(2):78-82.
40. Bruneel F, Tubach F, Corne P, Megarbane B, Mira JP, Peytel E, et al. Severe imported *falciparum* malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PLoS One*. 2010;5(10):e13236.
41. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N. Artesunate versus quinine for treatment of severe *falciparum* malaria: a randomised trial. *Lancet*. 2005 Aug 27-Sep 2;366(9487):717-25.

42. Bruneel F, Thellier M, Eloy O, Mazier D, Boulard G, Danis M, et al. Transfusion-transmitted malaria. *Intensive Care Med.* 2004 Sep;30(9):1851-2.
43. Saïssy J. Severe malaria. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale.* 2001.
44. White NJ, Miller KD, Marsh K, Berry CD, Turner RC, Williamson DH, et al. Hypoglycaemia in African children with severe malaria. *Lancet.* 1987 Mar 28;1(8535):708-11.
45. Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Fletcher KA, Morris K. Blood glucose levels in Malawian children before and during the administration of intravenous quinine for severe *falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 1988 Oct 20;319(16):1040-7.
46. Kowo NG, Msengi AE, Swai AB, Chuwa LM, Alberti KG, McLarty DG. Specificity of hypoglycaemia for cerebral malaria in children. *Lancet.* 1990 Aug 25;336(8713):454-7.
47. Pussard E, Barennes H, Daouda H, Clavier F, Sani AM, Osse M, et al. Quinine disposition in globally malnourished children with cerebral malaria. *Clin Pharmacol Ther.* 1999 May;65(5):500-10.
48. Daniels K, Lewin S. Translating research into maternal health care policy: a qualitative case study of the use of evidence in policies for the treatment of eclampsia and pre-eclampsia in South Africa. *Health Res Policy Syst.* 2008;6:12.
49. Rogiers V, Vercruyse A. Hepatocyte cultures in drug metabolism and toxicological research and testing. *Methods Mol Biol.* 1998;107:279-94.
50. Sergent E. [Definition of immunity and premunition]. *Arch Inst Pasteur Alger.* 1950;28(4):429-40.
51. Zwetyenga J, Rogier C, Tall A, Fontenille D, Snounou G, Trape JF, et al. No influence of age on infection complexity and allelic distribution in *Plasmodium falciparum* infections in Ndiop, a Senegalese village with seasonal, mesoendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Nov;59(5):726-35.
52. Rogerson SJ. Sequestration: causes and consequences. *Redox Rep.* 2003;8(5):295-9.
53. Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 2005 Aug;26(8):447-54.
54. Stevenson MM, Riley EM. Innate immunity to malaria. *Nat Rev Immunol.* 2004 Mar;4(3):169-80.
55. Orago AS, Facer CA. Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for *Plasmodium falciparum* erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin. *Clin Exp Immunol.* 1991 Oct;86(1):22-9.
56. Mavoungou E, Luty AJ, Kremsner PG. Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of *Plasmodium falciparum*-infected human red blood cells in vitro. *Eur Cytokine Netw.* 2003 Jul-Sep;14(3):134-42.
57. Roland J, Soulard V, Sellier C, Drapier AM, Di Santo JP, Cazenave PA, et al. NK cell responses to *Plasmodium* infection and control of intrahepatic parasite development. *J Immunol.* 2006 Jul 15;177(2):1229-39.
58. Viret C, Lantz O, He X, Bendelac A, Janeway CA, Jr. A NK1.1+ thymocyte-derived TCR beta-chain transgene promotes positive selection of thymic NK1.1+ alpha beta T cells. *J Immunol.* 2000 Sep 15;165(6):3004-14.
59. Mohan K, Moulin P, Stevenson MM. Natural killer cell cytokine production, not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. *J Immunol.* 1997 Nov 15;159(10):4990-8.
60. McGregor IA, Williams K, Goodwin LG. Pyrimethamine and Sulphadiazine in Treatment of Malaria. *Br Med J.* 1963 Sep 21;2(5359):728-9.
61. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Bouharoun-Tayoun H, Chantavanich P, et al. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 Sep;45(3):297-308.
62. Cohen S, Mc GI, Carrington S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature.* 1961 Nov 25;192:733-7.
63. Bouharoun-Tayoun H, Attanath P, Sabchareon A, Chongsuphajaisiddhi T, Druilhe P. Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own

- inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1633-41.
64. Shi YP, Udhayakumar V, Oloo AJ, Nahlen BL, Lal AA. Differential effect and interaction of monocytes, hyperimmune sera, and immunoglobulin G on the growth of asexual stage *Plasmodium falciparum* parasites. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Jan;60(1):135-41.
65. Rzepczyk CM, Hale K, Woodroffe N, Bobogare A, Csurhes P, Ishii A, et al. Humoral immune responses of Solomon Islanders to the merozoite surface antigen 2 of *Plasmodium falciparum* show pronounced skewing towards antibodies of the immunoglobulin G3 subclass. *Infect Immun.* 1997 Mar;65(3):1098-100.
66. Aribot G, Rogier C, Sarthou JL, Trape JF, Balde AT, Druilhe P, et al. Pattern of immunoglobulin isotype response to *Plasmodium falciparum* blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa). *Am J Trop Med Hyg.* 1996 May;54(5):449-57.
67. Aucan C, Traore Y, Tall F, Nacro B, Traore-Leroux T, Fumoux F, et al. High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun.* 2000 Mar;68(3):1252-8.
68. Wahlin B, Wahlgren M, Perlmann H, Berzins K, Bjorkman A, Patarroyo ME, et al. Human antibodies to a Mr 155,000 *Plasmodium falciparum* antigen efficiently inhibit merozoite invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Dec;81(24):7912-6.
69. Udeinya IJ, Schmidt JA, Aikawa M, Miller LH, Green I. *Falciparum* malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells. *Science.* 1981 Jul 31;213(4507):555-7.
70. Treutiger CJ, Hedlund I, Helmby H, Carlson J, Jepson A, Twumasi P, et al. Rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 May;46(5):503-10.
71. Kumaratilake LM, Ferrante A, Jaeger T, Rzepczyk C. GM-CSF-induced priming of human neutrophils for enhanced phagocytosis and killing of asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: synergistic effects of GM-CSF and TNF. *Parasite Immunol.* 1996 Mar;18(3):115-23.
72. Bouharoun-Tayoun H, Oeuvray C, Lunel F, Druilhe P. Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *J Exp Med.* 1995 Aug 1;182(2):409-18.
73. Mohan K SM. Acquired immunity to asexual blood stages. *ASM Press.* 1998.:pp. 467-93.
74. Ho M, Webster HK. Immunology of human malaria. A cellular perspective. *Parasite Immunol.* 1989 Mar;11(2):105-16.
75. Aidoo M, Udhayakumar V. Field studies of cytotoxic T lymphocytes in malaria infections: implications for malaria vaccine development. *Parasitol Today.* 2000 Feb;16(2):50-6.
76. Troye-Blomberg M, Berzins K, Perlmann P. T-cell control of immunity to the asexual blood stages of the malaria parasite. *Crit Rev Immunol.* 1994;14(2):131-55.
77. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. *Folia Biol (Praha).* 2000;46(6):210-8.
78. Troye-Blomberg M, Riley EM, Kabilan L, Holmberg M, Perlmann H, Andersson U, et al. Production by activated human T cells of interleukin 4 but not interferon-gamma is associated with elevated levels of serum antibodies to activating malaria antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jul;87(14):5484-8.
79. Nardin EH, Nussenzweig RS. T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:687-727.
80. Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, Anstey NM, Twumasi P, Rowe PA, et al. Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature.* 1991 Aug 15;352(6336):595-600.
81. Diallo S, Konate L, Faye O, Ndir O, Faye M, Gueye A, et al. [Malaria in the southern sanitary district of Dakar (Senegal). 2. Entomologic data]. *Bull Soc Pathol Exot.* 1998;91(3):259-63.

82. Salem G LGF. Espace urbain et risque anophélien à Pikine (Sénégal). cahier santé. 1994;1:347-94.
83. Diallo S, Konate L, Ndir O, Dieng T, Dieng Y, Bah IB, et al. [Malaria in the central health district of Dakar (Senegal). Entomological, parasitological and clinical data]. Sante. 2000 May-Jun;10(3):221-9.
84. Gaye O, Faye O, Bah IB, Diallo S, Diouf M, Ndiaye P, et al. [Development of chloroquine resistance in an urban area. Results of surveys in Dakar and Pikine]. Ann Soc Belg Med Trop. 1991 Dec;71(4):329-30.
85. Gaye O, Babou I, Faye O, Fall A, Molez JF, Bah IB, et al. [Malaria morbidity and therapeutic efficacy of antimalarials. Study conducted in the Dakar region]. Med Trop (Mars). 1993 Oct-Dec;53(4):479-85.
86. Trape JF, Rogier C, Konate L, Diagne N, Bouganali H, Canque B, et al. The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. Am J Trop Med Hyg. 1994 Aug;51(2):123-37.
87. Beier JC. Malaria parasite development in mosquitoes. Annu Rev Entomol. 1998;43:519-43.
88. Nguer CM, Diallo TO, Diouf A, Tall A, Dieye A, Perraut R, et al. *Plasmodium falciparum*- and merozoite surface protein 1-specific antibody isotype balance in immune Senegalese adults. Infect Immun. 1997 Nov;65(11):4873-6.
89. Gysin J. Relevance of the squirrel monkey as a model for experimental human malaria. Res Immunol. 1991 Oct;142(8):649-54.
90. Scanf L. Etude moléculaire et immunologique de deux variants antigéniques de *Plasmodium falciparum* induisant une réponse immune spécifique chez le singe Saimiri sciureus. Thèse de doctorat de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. 1996.
91. Fandeur T, Le Scanf C, Bonnemains B, Slomianny C, Mercereau-Puijalon O. Immune pressure selects for *Plasmodium falciparum* parasites presenting distinct red blood cell surface antigens and inducing strain-specific protection in Saimiri sciureus monkeys. J Exp Med. 1995 Jan 1;181(1):283-95.
92. Mattei D, Scherf A. The Pf332 gene of *Plasmodium falciparum* codes for a giant protein that is translocated from the parasite to the membrane of infected erythrocytes. Gene. 1992 Jan 2;110(1):71-9.
93. Perraut R. Approche expérimentale au développement de stratégies vaccinales: utilisation du singe écureuil (Saimiri sciureus) pour l'évaluation d'adjuvants de l'immunité et de candidat vaccin contre le paludisme. Docteur de l'Université de Paris V: 1995:p283.
94. Favaloro JM, Coppel RL, Corcoran LM, Foote SJ, Brown GV, Anders RF, et al. Structure of the RESA gene of *Plasmodium falciparum*. Nucleic Acids Res. 1986 Nov 11;14(21):8265-77.
95. Culvenor JG, Day KP, Anders RF. *Plasmodium falciparum* ring-infected erythrocyte surface antigen is released from merozoite dense granules after erythrocyte invasion. Infect Immun. 1991 Mar;59(3):1183-7.
96. Foley M, Tilley L, Sawyer WH, Anders RF. The ring-infected erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum* associates with spectrin in the erythrocyte membrane. Mol Biochem Parasitol. 1991 May;46(1):137-47.
97. Coppel RL, Lustigman S, Murray L, Anders RF. MESA is a *Plasmodium falciparum* phosphoprotein associated with the erythrocyte membrane skeleton. Mol Biochem Parasitol. 1988 Dec;31(3):223-31.
98. Vigan-Womas I, Guillotte M, Juillerat A, Vallieres C, Lewit-Bentley A, Tall A, et al. Allelic diversity of the *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 entails variant-specific red cell surface epitopes. PLoS ONE. 2011;6(1):e16544.
99. OMS. World Malaria Report 2011. 2011:1-246.
100. Saissy JM, Rouvin B, Koulmann P. [Severe malaria in intensive care units in 2003]. Med Trop (Mars). 2003;63(3):258-66.

101. Aissata Basse Ndiaye. THESE DE PHARMACIE Dakar; 2014.
102. Perraut R, Mercereau-puijalon, O., Diouf, B., Tall, A., Guillotte, M., Le Scanf, C., Trape, J. F., Spiegel, A., and Garraud, O. Seasonal fluctuation of antibody levels to *Plasmodium falciparum* parasitized red blood cell-associated antigens in two senegalese villages with different transmission conditions. Am J Trop Med Hyg. 2000;62:746-51.
103. Mbengue B SNM, M. DA, Tall A, TouréA, et al. antibodies responses to *P falciparum* blood stage crude extract in symptomatic patients living in an urban, low endemic area of Dakar. Dakar Med. 2010;55.20-5.
104. Mbengue B, Niang B, Diatta B, Tall A, Garraud O, Perraut R, et al. The use of crude *Plasmodium falciparum* antigens for comparison of antibody responses in patients with mild malaria vs. cerebral malaria. Iran J Immunol. 2010 Sep;7(3):150-61.
105. Newbold C, Craig A, Kyes S, Rowe A, Fernandez-Reyes D, Fagan T. Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. Int J Parasitol. 1999 Jun;29(6):927-37.
106. Gay F, Zougbede S, N'Dilimabaka N, Rebollo A, Mazier D, Moreno A. Cerebral malaria: what *Plasmodium falciparum* is known and what is on research. Rev Neurol (Paris). 2012 Mar;168(3):239-56.
107. Idro R, Otieno G, White S, Kahindi A, Fegan G, Ongutu B, et al. Decorticate, decerebrate and opisthotonic posturing and seizures in Kenyan children with cerebral malaria. Malar J. 2005;4:57.
108. Maitland K, Newton CR. Acidosis of severe *falciparum* malaria: heading for a shock? Trends Parasitol. 2005 Jan;21(1):11-6.
109. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM. Malaria. Lancet. 2013 Aug 15.
110. Noppadon Tangpukdee KMW SM, S Kano, N Phophak, J , Tiemprasert SK, P Wilairatana. Indicators of fatal outcome in severe *P falciparum* malaria: a study in a tertiary-care hospital in Thailand. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2010;855-9.
111. Moulin F, Lesage F, Legros AH, Maroga C, Moussavou A, Guyon P, et al. Thrombocytopenia and malaria in children with different exposures. Arch Dis Child. 2003 Jun;88(6):540-1.
112. Carlson J, Helmy H, Hill AV, Brewster D, Greenwood BM, Wahlgren M. Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. Lancet. 1990 Dec 15;336(8729):1457-60.
113. Marsh K, Otoo L, Hayes RJ, Carson DC, Greenwood BM. Antibodies to blood stage antigens of *Plasmodium falciparum* in rural Gambians and their relation to protection against infection. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989 May-Jun;83(3):293-303.
114. Tippett E, Fernandes LA, Rogerson SJ, Jaworowski A. A novel flow cytometric phagocytosis assay of malaria-infected erythrocytes. J Immunol Methods. 2007 Aug 31;325(1-2):42-50.
115. Chen Q. The naturally acquired immunity in severe malaria and its implication for a PfEMP-1 based vaccine. Microbes Infect. 2007 May;9(6):777-83.
116. Mackintosh CL, Mwangi T, Kinyanjui SM, Mosobo M, Pinches R, Williams TN, et al. Failure to respond to the surface of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes predicts susceptibility to clinical malaria amongst African children. Int J Parasitol. 2008 Oct;38(12):1445-54.
117. Bull PC, Lowe BS, Kaleli N, Njuga F, Kortok M, Ross A, et al. *Plasmodium falciparum* infections are associated with agglutinating antibodies to parasite-infected erythrocyte surface antigens among healthy Kenyan children. J Infect Dis. 2002 Jun 1;185(11):1688-91.
118. Mbengue B. Facteurs biologiques de gravité du paludisme à *P. falciparum*: Implications immunologiques et vaccinales Thèse és sciences pharmaceutiques. 2007:p 250.

