

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Vers la compréhension de l'immunité cellulaire
dans le paludisme cérébral

THESE

Présentée à la Faculté de Pharmacie de Montpellier

En vue d'obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par

Jade ROYO

Soutenue le 19 janvier 2018

Président : M. Emmanuel CORNILLOT, Professeur des Universités

Assesseurs : Mme Agnès AUBOUY, Chargée de recherche IRD (directrice de thèse)

M. Sébastien BERTOUT, Professeur des Universités

M. Jean GIAIMIS, Professeur des Universités

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mr Emmanuel Cornillot pour avoir accepté d'être président de mon jury de thèse, mais également pour m'avoir accompagnée et soutenue dans mon projet professionnel depuis maintenant 3 ans. Merci pour vos conseils et tout le temps que vous m'avez accordé.

Un immense merci à Agnès Aubouy, ma directrice de thèse d'exercice et de recherche, pour me faire confiance depuis le début, pour m'avoir poussée et avoir cru en moi, et pour m'avoir proposé de participer à ce projet de recherche au Bénin. Merci de m'avoir si bien encadrée tout au long de ces deux stages de M1 et M2 et de m'avoir donné la possibilité de poursuivre ce travail avec toi jusqu'en thèse de recherche. Que je sois en France ou au Bénin, tu as toujours été disponible et de très bons conseils. Tous ces moments resteront une expérience humaine et professionnelle exceptionnelle. MERCI.

Merci à Mr Jean Giaimis et Mr Sébastien Bertout d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse mais aussi pour vos enseignements durant mes études de pharmacie.

Mes remerciements vont également à Agnès Coste et Bernard Pipy pour m'avoir si bien accueillie au sein de votre équipe de recherche ainsi que pour les discussions très intéressantes que l'on a pu échanger. Merci pour vos conseils toujours très pertinents et le partage de vos connaissances scientifiques.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe PHARMA-DEV pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur, en particulier à Hélène Authier pour sa gentillesse et ses précieuses remarques mais également à mes collègues thésards, Godychou, Mounamoon, Mélichoupi I et II, Aïssati, Marie, Momo, car le travail passe aussi par de grands moments de rire et de bonheur, merci d'y contribuer un peu plus chaque jour.

Merci à Philippe Batigne, notre souris-man préféré, toujours optimiste et de bonne humeur, mais également à Bénédicte, José et Saliha.

Je remercie mes collègues du laboratoire MERIT à Paris ainsi que ceux de l'ISBA au Bénin. Merci à Gwladys Bertin, co-responsable du projet au Bénin, pour avoir réalisé un tel travail de terrain et accepté ma participation, merci pour tous tes conseils et ta bonne humeur !

Un grand merci à mes deux collègues de terrain, Claire Kamaliddin et Sem Ezinmegnon. Inséparables pendant les trois mois de prélèvement, de jours comme de nuit, nous avons formé une équipe de choc, soudée et dynamique ! Cette mission au Bénin n'aurait vraiment pas été la même sans vous !

Merci au Professeur Jules Alao, responsable du secteur pédiatrique de l'hôpital d'HOMEL à Cotonou, pour avoir accepté que son établissement participe à l'étude et pour son soutien tout au long de ma mission. Merci également à l'ensemble du personnel soignant de l'hôpital d'HOMEL et du centre médical de Saint-Joseph.

Merci à ma famille, mes essentiels. Merci papa, merci maman. Merci de m'avoir permis de vivre cette vie de rêve avec vous, de nous avoir transmis vos valeurs humaines, votre optimisme et votre sens de l'aventure. Rien n'est impossible avec vous, du moment que l'on ose y croire et que l'on se donne les moyens d'y arriver. Merci à ma grande sœur, ma Momo, ma Schirloupette (tout court !), mon alter égo. Tu es mon plus grand bonheur, ma plus grande fierté. Je t'aime.

Merci à mes amis d'enfance, mes Bouakéens : Audrey, Fa, Magui, Hugo, Had', Charlie, Thomas, Antoine, Vincent, ... L'Afrique fait partie de nous, de notre vécu et de notre avenir. « De toute façon, il y a quelque chose qui va au-delà du temps et des frontières entre nous, c'est ancré comme une façon de vivre » Vinc' G.

Merci à Abou, une force de la nature, je t'admire pour ton courage, ton talent, et ton humanité. Ton sourire reste gravé dans ma tête à jamais, comme tous ces moments de partage autour de ton Djembé et ta musique. Tu es une source d'inspiration éternelle.

Merci à mes amis du lycée, bien trop nombreux pour tous vous citer, vous vous reconnaitrez dans « le Système ». 😊 On s'était donné rendez-vous dans 10 ans, et aujourd'hui rien n'a changé, vous êtes toujours aussi extraordinaires. Quelle chance de pouvoir encore se retrouver et pouvoir compter les uns sur les autres.

Enfin, je tiens à remercier toute ma promo et mes amis de pharmacie. 6 ans de partages, d'études, de travail et de soirées, ce sont des rencontres que l'on n'oublie jamais.

Un merci particulier à Ophélie, ma Féfinette d'amour, ma meilleure amie, mon binôme. On formait une sacrée équipe, inséparable dans le boulot comme dans les loisirs. Tu as été un élément essentiel à mon quotidien, et je sais qu'une amitié comme celle-ci est loin d'être terminée, à nous de la faire perdurer encore longtemps.

Merci à Rorie et à Barbara, complétant ainsi le quatuor de l'ambiance, je garde de ces 6 belles années d'études et d'amitié un concentré de bonheur, d'éclats de rire et de complicité. Vous me manquez...

Merci à Vincent, pour m'avoir encouragée et soutenue dans l'écriture de cette thèse, jusqu'au pied du Machu Picchu... oui oui, on s'en rappellera encore longtemps de cela !

Merci à Flo pour cette belle rencontre, pour ton talent inné pour la musique (you rock !) et tes imitations d'oiseaux !

Merci à Meg', ma petite fleur et coloc' de choc. Ma nouvelle vie à Toulouse sans toi ? Pas question ! Mon quotidien est bien trop heureux de partager nos fou-rires, débats culinaires et autres discussions girly !

Enfin, merci à eux, Sabatier et Benji, mes deux plus belles rencontres durant ces années d'études. Un véritable coup de cœur amical. Parfois les mots nous manquent pour exprimer notre reconnaissance, mais peu importe, l'essentiel est que vous le sachiez. Nous sommes le Trio inséparable, comme avant et pour encore longtemps : « Toujours plus, ! » 😊

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ANNEXES	12
INTRODUCTION.....	13

1ERE PARTIE : GENERALITES SUR LE PALUDISME 15

I – HISTOIRE DE LA MALADIE 16

II – IMPACT MONDIAL DU PALUDISME 18

III – LE PARASITE 20

1. CLASSIFICATION	20
2. LES DIFFERENTES ESPECES DE PLASMODIUM	21
2.1) <i>Plasmodium falciparum</i>	21
2.2) <i>Plasmodium vivax</i>	21
2.3) <i>Plasmodium ovale</i>	22
2.4) <i>Plasmodium malariae</i>	22
2.5) <i>Plasmodium knowlesi</i>	22

IV – EPIDEMIOLOGIE..... 23

1. LE VECTEUR	23
2. CYCLE DE DEVELOPPEMENT	24
2.1) Cycle asexué chez l'homme	24
2.2) Cycle sexué chez le moustique.....	25
3. LES DIFFERENTS MODES DE TRANSMISSION PALUSTRE	27
3.1) Contamination par le vecteur.....	27
3.2) Paludisme transfusionnel	27
3.3) Paludisme congénital ou transplacentaire	28
4. REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU PALUDISME.....	28
4.1) Zones d'endémicité palustre.....	28
4.2) Classification épidémiologique	30

V – PHYSIOPATOLOGIE ET SYMPTOMATOLOGIE..... 32

1.	PHYSIOPATHOLOGIE GENERALE.....	32
2.	FACTEURS HUMAINS DE SENSIBILITE A L'INFECTION	32
	2.1) <i>La réponse immunitaire de l'hôte</i>	32
	2.2) <i>Facteurs génétiques</i>	34
3.	TABLEAUX CLINIQUES ET BIOLOGIQUES	34
	3.1) <i>Accès palustre simple</i>	35
	3.2) <i>Accès palustres graves à P. falciparum</i>	35
VI – DIAGNOSTIC		40
1.	DIAGNOSTIC DE PRESOMPTION	40
	1.1) <i>Interrogatoire du patient : Séjour en zone d'endémie</i>	40
	1.2) <i>Examen clinique</i>	40
	1.3) <i>Examen biologique : NFS</i>	40
2.	DIAGNOSTIC DE CERTITUDE.....	41
	2.1) <i>Examens microscopiques</i>	41
	2.2) <i>Le test de diagnostic rapide, ou TDR</i>	42
	2.3) <i>La PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	43
3.	DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE	44
VII – TRAITEMENTS		45
1.	CLASSIFICATION DES PRINCIPAUX ANTIPALUDIQUES	45
	1.1) <i>Les schizonticides érythrocytaires</i>	45
	1.2) <i>Les gamétocytocides</i>	46
	1.3) <i>Les bithérapies</i>	46
2.	TRAITEMENT DU PALUDISME A P. FALCIPARUM.....	51
	2.1) <i>Traitements des formes simples</i>	51
	2.2) <i>Traitements des formes graves</i>	52
3.	TRAITEMENTS DES AUTRES ESPECES DE PLASMODIUM	53
	3.1) <i>Traitement des formes simples</i>	53
	3.2) <i>Traitement des formes graves</i>	54
VIII – PREVENTION ET LUTTE.....		56
1.	LES MOYENS ACTUELLEMENT DISPONIBLES.....	56
	1.1) <i>Protection contre les piqûres de moustiques</i>	56
	1.2) <i>Chimio prophylaxie</i>	57
	1.3) <i>Traitements préventifs</i>	58
	1.4) <i>La recherche vaccinale</i>	60
2.	BILAN ET OBJECTIFS DE L'OMS.....	61
IX – RESISTANCE PARASITAIRE		63

2EME PARTIE : ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE CELLULAIRE DANS LE NEUROPALUDISME CHEZ DES ENFANTS BENINOIS	65
INTRODUCTION.....	66
1. PHYSIOPATHOLOGIE ET ROLE DE LA REPONSE IMMUNITAIRE DANS LE NEUROPALUDISME.....	66
2. STRATEGIES IMMUNOTHERAPEUTIQUES	68
2.1) <i>Les molécules utilisées couramment</i>	68
2.2) <i>Les molécules testées par des protocoles de recherche</i>	69
OBJECTIFS DU PROJET	72
METHODES	74
1. ASPECTS ETHIQUES.....	74
2. SITE ET POPULATION D'ETUDE.....	74
3. TDR, GOUTTES EPAISSES ET FROTTIS SANGUINS (GE/FS)	75
4. PRELEVEMENTS SANGUINS ET BILANS BIOLOGIQUES	75
5. SEPARATION DES CELLULES MONONUCLEES (PBMC)	76
6. MESURE DU POURCENTAGE DE POPULATIONS CELLULAIRES ET DE LEUR ETAT D'ACTIVATION PAR LA CYTOMETRIE EN FLUX	76
6.1) <i>Principe de la cytométrie en flux</i>	76
6.2) <i>Préparation des échantillons de PBMC et analyse en cytométrie de flux</i>	77
6.3) <i>Acquisition informatique des données et stratégie d'analyse de la cytométrie en flux</i>	79
7. ANALYSE STATISTIQUE.....	80
7.1) <i>Calcul du nombre de sujets nécessaires et de la puissance de l'étude</i>	80
7.2) <i>Analyse descriptive des deux bases de données 2014 et 2016</i>	81
7.3) <i>Analyse descriptive des données de base des échantillonnages de 2014 et 2016</i>	81
7.4) <i>Recherche de critères spécifiques du type d'accès palustre</i>	81
7.5) <i>Régressions linéaire et logistique</i>	82
RESULTATS.....	83
1. ANALYSE DESCRIPTIVE DES DEUX BASES DE DONNEES 2014 ET 2016.....	83
1.1) <i>Détermination des groupes cliniques définitifs</i>	83
1.2) <i>Comparaison des prélèvements 2014 et 2016 à J0</i>	84
1.3) <i>Recherche des critères sociaux, cliniques et biologiques spécifiques des groupes UM, SMA et CM</i> ..	85
1.4) <i>Analyses des données immunologiques de cytométrie pour la recherche de facteurs spécifiques des groupes cliniques</i>	91
2. RECHERCHE DES FACTEURS DE RISQUE ET DE PROTECTION DU NEUROPALUDISME	94
2.1) <i>Analyse univariée (régression linéaire)</i>	94
2.2) <i>Analyse multivariée (régression logistique)</i>	95

DISCUSSION	97
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	103
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	106
ANNEXES	115

LISTE DES ABREVIATIONS

AC	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
ATCD	Antécédant
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BEH	Bulletin épidémiologique hebdomadaire (InVS)
CD	Cluster de différenciation
CM	Cerebral malaria (neuropaludisme)
CPS	Chimioprévention du paludisme saisonnier
CRP	Protéine C-Réactive
CSP	Circumsporozoïte
CTA	Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DP	Densité parasitaire
EMA	Agence Européenne du Médicament
FiO ₂	Fraction inspirée en oxygène
FS	Frottis sanguin
GE	Goutte épaisse
GR	Globule rouge
GRi	Globule rouge infecté
Hb	Hémoglobine
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukine
IM	Intra-musculaire
IV	Intra-veineux
LB	Lymphocyte B
LPP	Liaison aux Protéines Plasmatiques
LT	Lymphocyte T
MCP-1	Monocyte Chemoattractant protein 1
MID	Moustiquaires à Imprégnation durable

MSP	Merozoïte Surface Protein
NFS	Numération Formule Sanguine
NK	Cellules Natural Killer
Nrf2	Nuclear factor erythroid-2-related factor 2
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PaO2	Pression partielle de l'O2
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (cellules mononuclées du sang périphérique)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1
PO	<i>Per os</i> (par voie orale)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SB	Score de Blantyre
SFM	Serum-Free Media
SMA	Severe malarial anemia (Anémie sévère palustre)
SpO2	Saturation pulsée de l'hémoglobine en oxygène
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T reg	Lymphocyte T régulateur
TDR	Test de Diagnostic Rapide
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPIg	Traitement Préventif Intermittent pendant la grossesse
TPIIn	Traitement Préventif Intermittent du nourrisson
UM	Uncomplicated malaria (accès palustre simple)
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VSA	Antigènes variants de surface

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution de la répartition mondiale des cas de paludisme entre les années 2000 et 2016 (Rapport sur le paludisme dans le Monde, OMS, 2016)

Figure 2 : Répartition mondiale des pays touchés par la pauvreté et le paludisme (OMS, 2013)

Figure 3 : Forme sanguine asexuée de *P. falciparum* (Bannister et al, 2000)

Figure 4 : Anophèle femelle, moustique vecteur du paludisme, (<http://moustiques.fr>)

Figure 5 : Cycle de vie de *P. falciparum* chez l'homme et chez le moustique (CDC)

Figure 6 : Frottis sanguin et goutte épaisse (CIRAD)

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

Figure 8 : Algorithme de prise en charge face à un paludisme en France (Spilf)

Figure 9 : Pourcentage de femmes enceintes ayant reçu un TPIp, par nombre de doses en Afrique subsaharienne entre 2010 et 2015 (Rapport sur le paludisme dans le monde, OMS, 2016)

Figure 10 : Pourcentage de la population non couverte par MID ou PID, pourcentage de femmes enceintes n'ayant pas reçu trois doses de TPIp et pourcentage d'enfants fiévreux non pris en charge, en Afrique sub-saharienne, (Rapport sur le paludisme dans le monde, OMS, 2016)

Figure 11 : Mécanismes physiopathologiques du neuropaludisme

Figure 12 : Séparation des PBMC par centrifugation en gradient de densité (d'après Ruber M., 2015)

Figure 13a : Diagramme de flux pour les prélèvements 2014

Figure 13b : Diagramme de flux pour les prélèvements 2016

Figure 14 : Paramètres caractéristiques du groupe SMA à J0 par rapport aux deux autres groupes (UM et SMA), Bénin 2016.

Figure 15 : Paramètres caractéristiques du groupe CM à J0 par rapport aux deux autres groupes (UM et SMA), Bénin 2016.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des zones d'endémicité palustre

Tableau 2 : Signes et symptômes du paludisme grave chez l'adulte et l'enfant (Prise en charge du paludisme grave, Guide Pratique, OMS, 2013)

Tableau 3 : Principales molécules antipaludiques actuellement recommandées par l'OMS

Tableau 4 : Médicaments utilisés en chimioprophylaxie du paludisme chez l'adulte et l'enfant (InVS, BEH, 2015)

Tableau 5a : Description des différentes populations cellulaires présentes dans les PBMC et anticorps spécifiques utilisés pour leurs identifications par cytométrie en flux (Panel 1)

Tableau 5b : Localisation et fonction des récepteurs ciblés pour l'étude de l'activation des lymphocytes T CD8 et anticorps utilisés en cytométrie en flux (Panel 2)

Tableau 5c : Localisation et fonction des récepteurs ciblés pour l'étude de l'activation des monocytes et anticorps utilisés en cytométrie en flux (Panel 3)

Tableau 6a : Comparaison des données sociales, cliniques et biologiques entre les patients atteints de paludisme simple en 2014 (UM14) et 2016 (UM16)

Tableau 6b : Comparaison des données sociales, cliniques et biologiques entre les patients atteints de neuropaludisme en 2014 (CM14) et 2016 (CM16)

Tableau 7a : Données sociales des 3 groupes de patients présentant un paludisme simple (UM), une anémie sévère palustre (SMA) ou un neuropaludisme (CM), Bénin 2016

Tableau 7b : Détails de la prise en charge médicale à J0 des 3 groupes de patients présentant un paludisme simple (UM), une anémie sévère palustre (SMA) ou un neuropaludisme (CM), Bénin 2016

Tableau 7c : Données clinico-biologiques des trois groupes de patients présentant un paludisme simple (UM), une anémie sévère palustre (SMA) ou un neuropaludisme (CM), Bénin 2016

Tableau 7d : Synthèse des critères socio-cliniques caractérisant les groupes UM et CM en 2016

Tableau 8a : Etude de la répartition des différentes populations cellulaires par cytométrie en flux en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

Tableau 8b : Etude de l'activation des Lymphocytes T CD8 par cytométrie en flux, en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

Tableau 8c : Etude de l'activation des Monocytes par cytométrie en flux, en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

Tableau 9 : Analyse univariée des facteurs liés au groupe neuropaludisme. Bénin 2016

Tableau 10 : Analyse multivariée des facteurs liés au groupe neuropaludisme. Bénin 2016

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Echelle de Blantyre chez l'enfant de moins de 5 ans

Annexe 2 : Conduite à tenir lors des inclusions d'enfants atteints de paludisme grave à HOMEL

Annexe 3a : Note explicative distribuée aux parents avant l'inclusion des enfants dans le projet OpTIMuM

Annexe 3b : Consentement éclairé des parents, Projet OpTIMuM 2016

Annexe 4 : Questionnaire à remplir pour chaque enfant inclus dans le projet OpTIMuM à HOMEL

Annexe 5 : Principe de la cytométrie en flux (<http://www.univ-reims.fr>)

Annexe 6 : Stratégie d'analyse hiérarchique des échantillons, ou « gating »

INTRODUCTION

Le paludisme, ou malaria, est la parasitose la plus répandue à travers le monde et constitue un problème majeur de santé publique (1). Cette maladie est due à un parasite du genre *Plasmodium* dont cinq espèces infectent l'homme (*falciparum*, *malariae*, *ovale*, *vivax* et *knowlesi*). L'agent pathogène se transmet à l'homme via des piqûres de moustiques infectés, les anophèles femelles (2).

L'infection à *P. falciparum* est la plus commune et la plus dangereuse, pouvant conduire à un paludisme grave qui se décline en diverses pathologies, dont les plus fréquentes sont le neuropaludisme (ou paludisme cérébral), l'anémie sévère et la détresse respiratoire. Même correctement traitées, ces infections peuvent conduire à des séquelles neurologiques ou au décès du patient. Malgré une diminution du taux de mortalité depuis les années 2010, l'OMS a enregistré en 2015, 429 000 décès dus au paludisme, pathologie touchant principalement les enfants en région africaine (2). La prise en charge repose sur des traitements efficaces à base d'artémisinine ou de ses dérivés.

Cependant, *P. falciparum* a su développer des mécanismes de résistance à l'arsenal de molécules antipaludiques disponibles (1). L'émergence de résistance à l'artémisinine et ses dérivés en Asie du Sud-Est rend la situation actuelle critique. Il est donc urgent de chercher de nouvelles approches thérapeutiques en particulier contre les formes graves de la maladie, ce qui nécessite une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de ces différentes formes cliniques.

Ma thèse s'articulera en deux parties. Tout d'abord je présenterai les généralités sur l'infection palustre puis je développerai mes travaux de recherche effectués durant ma 5^{ème} et 6^{ème} année de pharmacie en étudiant le rôle de la réponse immune cellulaire dans le neuropaludisme chez des enfants béninois.

Ces travaux de recherche ont pour objectifs de mieux comprendre la physiopathologie du neuropaludisme dans le but *in fine* de proposer de nouvelles stratégies de prise en charge de cette maladie. En effet, malgré un traitement antipaludique efficace à base d'artémisinine, le taux de létalité du neuropaludisme est estimé à 20% et l'incidence des séquelles neurologiques entre 4 et 14% (3,4).

Ainsi, nous avons formulé l'hypothèse qu'il existait un profil spécifique du neuropaludisme impliquant des facteurs socio-culturels et des critères clinico-biologiques avec notamment la répartition et l'état d'activation des cellules de l'immunité (lymphocytes, monocytes, ...). Cette étude consiste à comparer les aspects socio-culturels, cliniques et immunologiques de patients présentant un neuropaludisme à un groupe d'anémie sévère (groupe contrôle de paludisme grave non cérébral sans tropisme particulier des parasites pour le cerveau), et à un groupe de paludisme simple, de manière à identifier les spécificités du neuropaludisme.

1^{ère} PARTIE :

GENERALITES SUR LE PALUDISME

I – HISTOIRE DE LA MALADIE

Le paludisme, ou malaria, tire son origine du latin *palus, paludis*, qui signifie « marais », et de l'italien *mal-aria* ou « mauvais air ».

La première trace d'ADN de *Plasmodium* a été découverte sur des momies égyptiennes datant de moins 3000 ans avant JC (5). Les premiers signes cliniques (céphalée, fièvre, frisson) ont été décrits en Egypte dans le papyrus d'Ebers et vers la même période en Chine. Au IV^{ème} siècle avant JC, dans « Le Livre des Epidémies » et « Consultations », Hippocrate précise ces signes cliniques et fait notamment allusion à des crises fébriles. Durant le Moyen-Age, l'Europe n'a pas été épargnée par le paludisme qui s'étendait de l'Espagne à la Russie, sans oublier la France où il persistera jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle.

Les premiers traitements à base d'écorce de Quinquina ont été découverts par Don Francisco Lopez en 1630 et il faudra attendre jusqu'en 1820 pour que les pharmaciens J. Pelletier et J.B. Caventou réussissent à isoler la quinine, le principe actif de la plante.

En 1880, le médecin militaire français Charles Alphonse Laveran identifia dans le sang des patients fébriles un parasite qu'il nomme *Haemamoeba malariae*, ce parasite disparaissant après administration de quinine (6). Il reçut le prix Nobel de médecine en 1907 pour l'ensemble de ses travaux. Durant l'année 1885, Marchiafava et Celli, deux chercheurs italiens, confirmeront la découverte de Laveran et nommeront ce parasite *Plasmodium*.

Le rôle exact de l'anophèle femelle comme moustique vecteur de la maladie ne sera identifié qu'en 1897 par le médecin anglais Sir Ronald Ross qui reçut le prix Nobel de médecine en 1902 (7). Deux ans plus tard, trois chercheurs italiens, Grassi, Bastianelli et Bignami décriront le cycle complet de *Plasmodium* chez le moustique. Il faudra cependant attendre plus de 20 ans pour que quatre espèces de *Plasmodium* capables d'infecter l'homme (*P. falciparum*, *vivax*, *ovale*, *malariae*) soient décrites et 1930 pour la découverte de *P. knowlesi* chez le singe. La culture *in vitro* de *P. falciparum* ne sera mise au point qu'en 1976 par W. Trager et J.B. Jensen, étape clé de la recherche sur le parasite et de nouvelles stratégies thérapeutiques (8). Le cycle complet du parasite ne sera quant à lui expliqué que dans les années 1980.

Aujourd'hui, malgré des avancées scientifiques majeures, de nombreuses questions sont encore sans réponse. La recherche vaccinale n'est toujours pas aboutie, et les parasites ont développé

des mécanismes de résistance à tous les antipaludiques disponibles aujourd'hui. Les recherches sur le parasite et la réponse de l'hôte sont donc essentielles afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques du paludisme.

II – IMPACT MONDIAL DU PALUDISME

Le paludisme est un problème majeur de santé publique et fait partie des 3 maladies prioritaires de l’OMS avec le VIH/SIDA et la tuberculose. C’est la parasitose la plus répandue à travers le monde et plus d’un tiers de la population mondiale est actuellement exposée au risque de paludisme (9). Ces dernières années, grâce à l’utilisation de moustiquaires imprégnées, des Tests de Diagnostic Rapide (TDR) et du développement de nouveaux traitements dérivés de l’artémisinine, l’incidence mondiale du paludisme a diminué (Figure 1). Cependant en 2015, le paludisme sévissait toujours dans 91 pays avec une incidence de 212 millions de nouveaux cas et environ 430 000 décès cette même année, majoritairement dus à *Plasmodium falciparum*. C’est en Afrique que le plus grand nombre d’infections est dénombré avec environ 90% des cas de paludisme et 92% des décès (9).

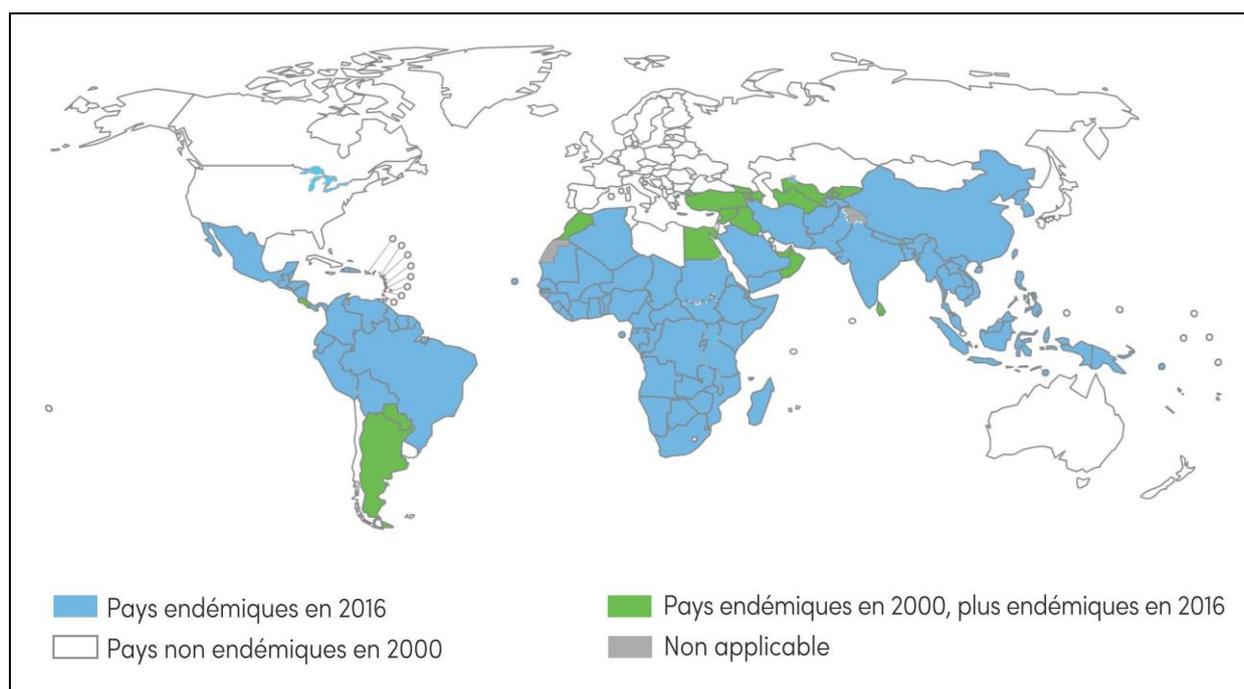


Figure 1 : Evolution de la répartition mondiale du paludisme entre les années 2000 et 2016 (Rapport sur le paludisme dans le monde, OMS, 2016)

Le paludisme touche principalement les personnes les plus vulnérables :

- les nourrissons, ayant un système immunitaire encore incompetent
- les enfants de moins de 5 ans vivant dans les zones où le paludisme est stable. Ils représentent environ 70% des décès dus à *P. falciparum*, soit environ 300 000 décès en 2015 (un enfant meurt du paludisme toutes les 2 minutes).

- les femmes enceintes surtout lors de leur 1^{ère} grossesse. Le paludisme peut alors être responsable d'avortements spontanés, d'accouchements prématurés ou de mort-nés mais également d'anémie sévère et d'autres complications graves chez la mère (la mortalité due au paludisme grave durant la grossesse est d'environ 50%).
- les personnes immunodéprimées et notamment celles porteuses du VIH
- les migrants et les voyageurs en zone d'endémie n'ayant pas d'immunité spécifique contre les parasites du paludisme.

Le paludisme impacte sensiblement le développement du pays dans lequel il sévit, ayant des conséquences sociales et économiques importantes (1). En effet, il touche majoritairement les classes sociales les moins favorisées, avec un faible niveau d'éducation qui n'utilisent pas les moyens de lutte adaptés pour se protéger des piqûres de moustiques et qui ont des difficultés d'accès aux structures de soins (Figure 2). Un récent rapport de l'OMS concernant plus de 20 pays africains a estimé que plus de 35% des enfants présentant une fièvre n'ont pas accès à une structure de soins leur permettant de bénéficier d'une prise en charge adéquate (10). De plus, les enfants ayant souffert de paludisme sévère ont plus de difficultés de scolarisation, de par les séquelles neurologiques éventuelles et de l'absentéisme scolaire. Pour les mêmes raisons, les adultes atteints de paludisme constituent un frein à la croissance économique de leur pays et limitent sa productivité.

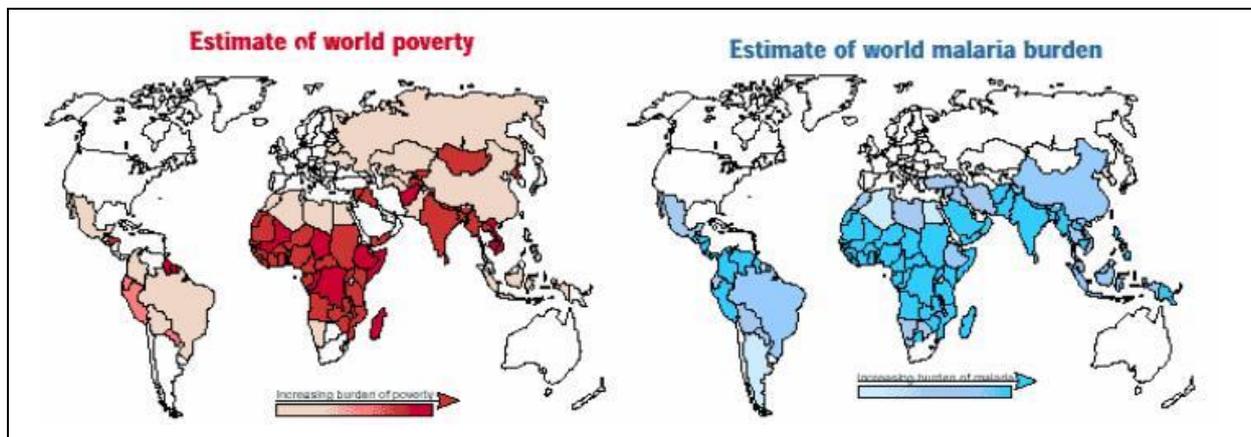


Figure 2: Répartition mondiale des pays touchés par la pauvreté et le paludisme (OMS, 2013)

III – LE PARASITE

1. Classification

Embranchement : *Apicomplexa*

Classe : *Sporozoea*

Sous-classe : *Coccidia*

Ordre : *Eucoccidia*

Sous-ordre : *Haemosporina*

Famille : *Plasmodiidae*

Genre : *Plasmodium*

L'agent du paludisme, ou *Plasmodium*, est un protozoaire parasite, c'est-à-dire un organisme eucaryote unicellulaire, vivant à l'intérieur des cellules de l'homme (hépatocytes puis globules rouges). Pour pénétrer dans ces cellules, il est doté d'un complexe apical composé de différentes structures (rhoptries, granules denses, micronèmes) participant à l'invasion et qui permettront de créer à l'intérieur du globule rouge la vacuole parasitophore qui séparera le parasite du cytoplasme (Figure 3) (11). Il semblerait que *Plasmodium* ait la capacité de sélectionner le GR le plus apte à l'accueillir en fonction de l'âge et de l'état du GR (12).

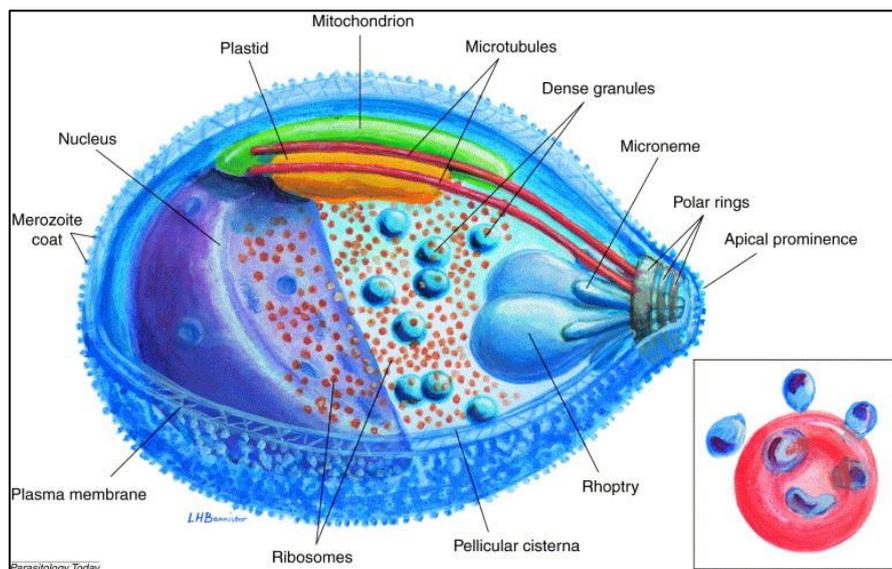


Figure 3 : Forme sanguine, asexuée, de *P. falciparum* (Bannister et al, 2000)

2. Les différentes espèces de *Plasmodium*

Sur plus d'une centaine d'espèce de *Plasmodium* actuellement identifiées, cinq espèces sont capables d'infecter l'homme : *P. falciparum*, *vivax*, *ovale*, *malariae* et *knowlesi*. Le réservoir est humain (sauf pour *P. knowlesi* dont le réservoir est simien). Certains patients peuvent être poly-parasités et donc être infectés simultanément par plusieurs espèces plasmodiales.

2.1) *Plasmodium falciparum*

P. falciparum est l'espèce la plus largement répandue à travers le monde, sévissant principalement dans les zones tropicales et inter-tropicales. Sa transmission est stoppée lorsque les températures descendent en dessous de 20°C, expliquant ainsi l'absence de paludisme au-dessus de 1 500 mètres d'altitude. *P. falciparum* infecte spécifiquement l'homme et est à l'origine de la grande majorité des paludismes graves et notamment du neuropaludisme. Il est également responsable en France d'environ 80% des cas de paludisme d'importation. Sa durée d'incubation est d'environ 7 à 12 jours ce qui correspond à la phase hépatique asymptomatique. Puis l'invasion des GR se traduit par une fièvre tierce maligne. L'infection à *P. falciparum* évolue sans rechute (il est rare de présenter un accès palustre plus de 2-3 mois après le départ d'une zone d'endémie), soit le patient est traité et guéri, soit il décède d'un paludisme grave. Le séquençage complet de *P. falciparum* a été réalisé en 2002. Ce dernier possède un matériel génétique composé de 14 chromosomes et de plus de 5 500 gènes. De plus, ce parasite est caractérisé par un polymorphisme génétique important. Pour la distinction des clones, les chercheurs se basent sur des protéines codées par des gènes polymorphes, c'est-à-dire comprenant des séquences variables (en taille et/ou en séquence) telles que les protéines de surface du mérozoïte MSP1 et MSP2 (11). Les recombinaisons génétiques, les pressions immunitaires de l'hôte et de l'environnement sont à l'origine de la diversité génétique du parasite et de ses antigènes. Ce polymorphisme génétique et protéique constitue une stratégie du parasite pour éviter la réponse immunitaire acquise (production d'anticorps spécifiques) et développer des mécanismes de résistance aux antipaludiques.

2.2) *Plasmodium vivax*

P. vivax est une espèce ayant une répartition large (fréquemment retrouvé en Amérique latine, en Asie, et en Afrique du Nord) mais est absente en Afrique noire. En effet, les GR Duffy

négatifs, majoritairement retrouvés chez des individus vivant en Afrique sub-saharienne, sont dépourvus du récepteur membranaire nécessaire à l'infection par *P. vivax*. Sa transmission est interrompue par des températures inférieures à 15°C. C'est un parasite strictement humain responsable d'une fièvre tierce bénigne pouvant parfois évoluer en paludisme grave. Sa durée d'incubation est de 15 jours mais des cas de rechutes (également appelées accès de reviviscence) ont été décrits et peuvent apparaître jusqu'à 4 ans après l'infection. Ces rechutes sont expliquées par la capacité de ce parasite à s'enkyster dans le foie, formant alors des hypnozoïtes et permettant au parasite de survivre. De plus, contrairement à *P. falciparum*, les formes sexuées (gamétocytes) de *P. vivax*, sont rapidement retrouvées dans la circulation sanguine, avant même l'apparition des premiers symptômes, accélérant alors la transmission palustre (13).

2.3) *Plasmodium ovale*

P. ovale est très proche de *P. vivax* mais sévit où ce dernier n'est pas, c'est-à-dire en Afrique noire. Il est également retrouvé dans quelques foyers en Asie du sud-est et dans certaines îles du Pacifique. C'est un parasite strictement humain responsable d'une fièvre tierce bénigne, pouvant parfois entraîner quelques complications graves (14). Sa durée d'incubation est de 15 jours mais il a été observé des cas de rechutes pouvant aller jusqu'à 4 ans après l'infection.

2.4) *Plasmodium malariae*

P. malariae présente une répartition plus clairsemée mais mondiale. Son hôte habituel est l'homme mais peut également toucher le singe. Il est responsable d'une fièvre quarte bénigne pouvant parfois entraîner des complications rénales (15). Sa durée d'incubation est de 2-3 semaines avec des rechutes possibles pouvant aller jusqu'à 20 ans après l'infection.

2.5) *Plasmodium knowlesi*

P. knowlesi sévit en Asie du Sud-Est. Son hôte habituel est le singe macaque mais l'homme peut être occasionnellement infecté par ce parasite (16,17). Le diagnostic d'une infection à *P. knowlesi* chez l'homme est difficile car le parasite est souvent confondu avec *P. malariae* ou *P. falciparum* (18). L'infection se manifeste par une fièvre quotidienne. Des complications sévères peuvent apparaître et devront donc être traitées rapidement comme des cas de *P. falciparum*. Il n'existe aujourd'hui aucune chimiorésistance décrite pour ce parasite.

IV – EPIDEMIOLOGIE

1. Le vecteur

Le paludisme est transmis à l'homme par l'intermédiaire d'un vecteur : l'anophèle femelle (Figure 4). Parmi les 400 espèces d'anophèles décrites dans la littérature, toutes ne sont pas capables de transmettre le paludisme (2). On en compte cependant une trentaine dont les principales sont *Anopheles gambiae*, en Afrique, *Anopheles darlingi* en Amérique du Sud et *Anopheles stephensi* en Asie.

Les anophèles se développent dans des zones chaudes et humides, expliquant ainsi l'importante prévalence du paludisme dans ces zones. Leurs gîtes sont retrouvés dans les crevasses, les rochers, le sol, ... La femelle n'est fécondée qu'une seule fois par l'anophèle mâle. Leur reproduction se fait dans l'eau où la femelle va venir pondre ses œufs. Ils se transformeront alors en larves aquatiques, et à la suite de 4 mues successives en nymphes puis en anophèles adultes (19). La durée de vie d'un adulte est de seulement quelques semaines et dépend fortement des conditions environnementales, notamment de la température. Sa longévité aura ainsi des conséquences sur l'efficacité de la transmission du parasite et donc de la maladie. De plus, la surface d'action des anophèles ne dépasse pas deux kilomètres, ce qui explique les différences de prévalence du paludisme entre deux zones géographiquement proches (2).

Seule la femelle est hématophage. Elle pique l'homme et se nourrit de son sang pour la maturation de ses œufs. L'anophèle femelle pique le soir et la nuit, attirée par le CO₂, et le sébum dégagé par les hommes. Une seule piqûre infectante par *Plasmodium*, silencieuse et indolore, suffit à transmettre le paludisme (19). Le moustique joue donc le rôle de vecteur de la maladie, et l'homme de réservoir du parasite.



Figure 4 : Anophèle femelle, moustique vecteur du paludisme (<https://moustiques.fr>)

2. Cycle de développement (Figure 5)

2.1) Cycle asexué chez l'homme

Chez l'homme (hôte intermédiaire) le parasite effectue 2 cycles asexués (ou schizogoniques). Le premier est un cycle hépatique (ou exo-érythrocytaire), totalement asymptomatique. Il n'a lieu qu'une fois et dure de 1 à 3 semaines selon l'espèce. Il débute au cours du repas sanguin de l'anophèle femelle. Le moustique parasité injecte à l'homme quelques dizaines de sporozoïtes (ou formes infestantes) qui migrent rapidement jusqu'au foie via la circulation sanguine. Durant cette courte période, les parasites sont visibles par le système immunitaire de l'hôte et peuvent donc être éliminés par des mécanismes de phagocytose. Une fois à l'intérieur des hépatocytes de l'homme, les parasites ne sont plus vulnérables et peuvent donc assurer leur multiplication et leur maturation. Dans le foie, les sporozoïtes deviennent des hépatozoïtes qui, après maturation se transforment en schizontes exo-érythrocytaires, appelés corps bleus (20). Dans le cas de *P. vivax* et *ovale*, les parasites peuvent rester quiescents dans les hépatocytes, sous la forme d'hypnozoïtes, expliquant ainsi les phénomènes de rechute observés pour ces espèces et absents pour *P. falciparum*. Ce phénomène n'a jamais été observé pour *P. malariae* qui présente cependant des accès de reviviscence tardifs jusqu'à 20 ans après l'infection. Après une phase de maturation et de multiplication, les cellules hépatocytaires vont éclater libérant ainsi dans la circulation sanguine des milliers de mérozoïtes (21).

Le second cycle chez l'homme est un cycle sanguin (ou érythrocytaire) pouvant s'effectuer plusieurs fois. Il dure 48h pour *P. falciparum*, *vivax* et *ovale*, et 72h pour *P. malariae*, ces périodicités correspondent aux différents pics fébriles observés lors des accès palustres.

Le cycle débute par la pénétration par endocytose des mérozoïtes dans les GR de l'homme. Ils vont rapidement évoluer en différentes phases : en anneau (ou bague à chaton), puis en trophozoïtes et en schizontes endo-érythrocytaires. Ces derniers dégradent l'hémoglobine (Hb) en hémozoïne, pigment malarique pyrogène responsable des accès fébriles et formant des amas pigmentaires intracytoplasmiques. Après maturation et multiplication, les schizontes se transforment en corps en rosace conduisant à l'éclatement des GR infectés (GRi) et à la libération de mérozoïtes dans la circulation sanguine qui pourront alors infecter de nouveaux globules rouges (20,21). Après un certain nombre de cycle ou suite à un stress, les parasites peuvent évoluer en gamétocytes mâle (macrogamétocyte) et femelle (microgamétocyte) qui resteront dans la circulation sanguine 10 à 15 jours dans le but d'être récupérés par un moustique

sain lors de son repas sanguin. Contrairement à *P. falciparum*, les gamétocytes de *P. vivax* sont très vite présents dans la circulation sanguine accélérant donc la transmission palustre (13).

2.2) Cycle sexué chez le moustique

Chez l'anophèle femelle, l'hôte définitif, le parasite réalise son cycle sexué (ou sporogonique), qui dure entre 10 et 20 jours. Dans l'estomac du moustique, sous l'influence de la diminution de la température, d'une augmentation du pH et de la présence d'acide xanthurinique, les gamétocytes ingérés évoluent en gamètes mâle (mobile car exflagellation) et femelle qui vont fusionner pour donner un ookinète (petit œuf mobile) (20). Ce dernier passera par effraction l'épithélium de l'estomac et se transformera en oocyste (œuf immobile) après fixation dans la paroi externe de l'estomac du moustique, moins de 24h après le repas sanguin du moustique. Après multiplication, l'oocyste évoluera en sporocyste contenant environ 10 000 sporozoïtes (formes infestantes) qui seront libérés dans la cavité générale du moustique entre 4 et 15 jours après le repas sanguin et migreront jusqu'à ses glandes salivaires dans l'attente d'un futur repas sanguin (21).

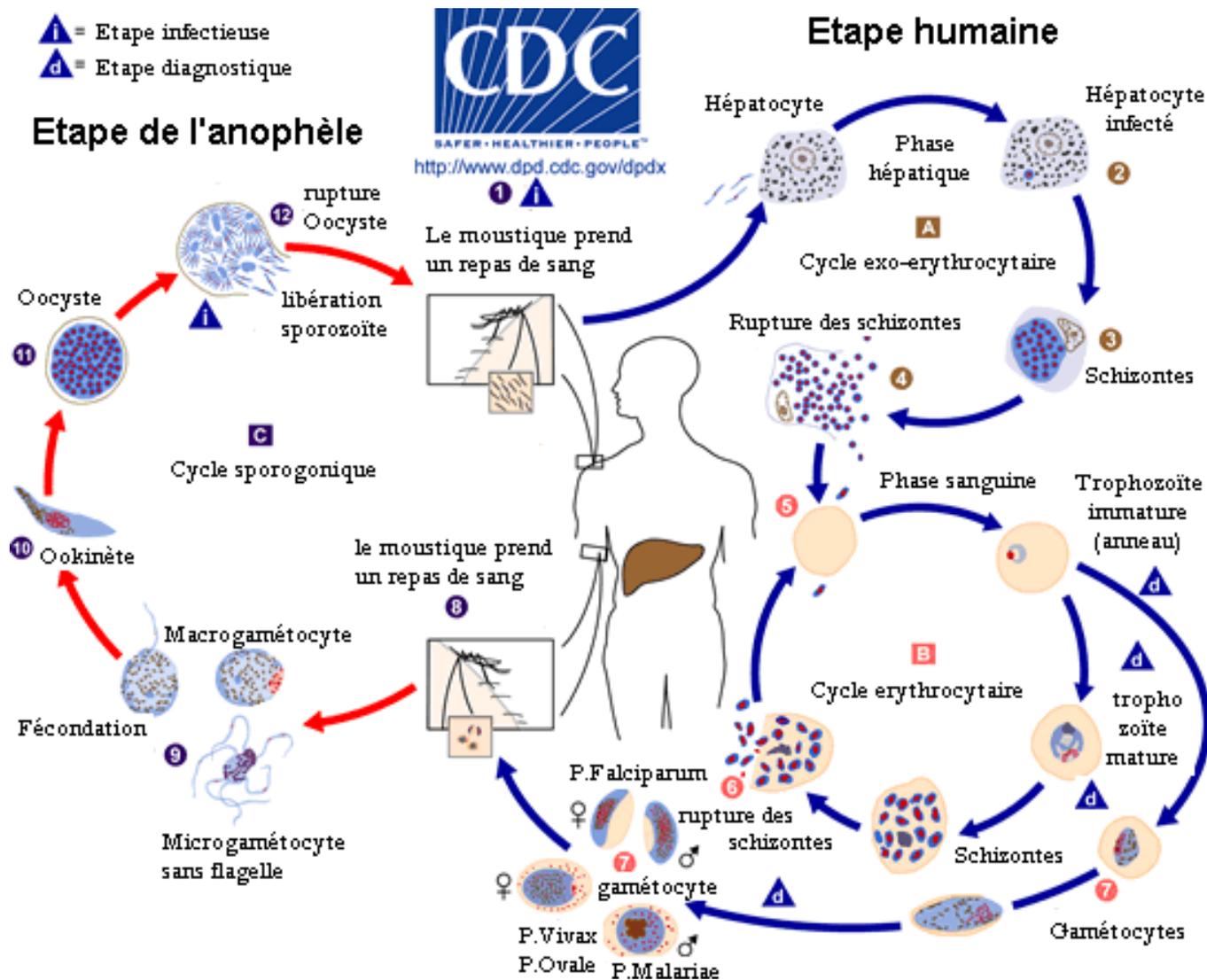


Figure 5 : Cycle de vie de *P. falciparum* chez l'homme (A et B) et le moustique (C). (CDC)

3. Les différents modes de transmission palustre

3.1) Contamination par le vecteur

* *Le paludisme autochtone* : C'est une infection contractée dans une zone d'endémie palustre. Dans les zones hyperendémiques, le paludisme survient surtout chez les femmes enceintes, les enfants de 6 mois à 10 ans et les immunodéprimés. Les personnes vivant dans ces zones d'hyperendémicité auront en effet développé une réponse anticorps (AC) spécifique de la population plasmodiale de la zone au bout d'une dizaine d'années (22,23). Les nouveau-nés et nourrissons sont quant à eux protégés par les AC maternels ainsi que par leur Hb fœtale qui ne convient pas au développement de *Plasmodium*.

* *Le paludisme d'importation* : Il correspond à une infection palustre observée hors zone d'endémie chez une personne revenant d'une zone d'endémie. En France, le nombre de cas de paludisme d'importation s'élève à environ 5 000 par an dont quelques dizaines de paludismes graves. Il est donc impératif de diagnostiquer et traiter ces patients en urgence.

* *Le paludisme des aéroports* : Rare, il correspond à une infection palustre contractée via des anophèles ayant été transportés par avion depuis une zone de transmission.

3.2) Paludisme transfusionnel

Les cinq espèces de *Plasmodium* infectant l'homme peuvent être transmises lors d'une contamination par le sang : lors d'une transfusion, suite à un accident d'exposition au sang ou lors du partage de seringue chez les usagers de drogues par intra-veineuse (IV).

Plasmodium étant un parasite intra-érythrocytaire, sa viabilité dépend donc de celle des GR. Ainsi, le risque de transmission du paludisme existe uniquement lors d'une contamination à partir de sang frais avec des GR intacts. La conservation des poches de sang au réfrigérateur ne permet pas de tuer les parasites qui peuvent résister environ 2 semaines à 4°C (24). C'est pourquoi en France, la recherche du parasite est systématique pour chaque don de sang. Malheureusement, dans la plupart des pays où le paludisme est endémique, ce dépistage n'est pas réalisé, sous-évaluant l'impact de cette voie de contamination.

3.3) Paludisme congénital ou transplacentaire

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

4. Répartition géographique du paludisme

4.1) Zones d'endémicité palustre

L'intensité de la transmission dépend de facteurs du parasite, de l'hôte, du vecteur mais également de l'environnement. La transmission est plus intense dans les zones où les moustiques vecteurs vivent plus longtemps et où ils piquent les humains plutôt que les animaux (ce qui est notamment le cas en Afrique). Cette transmission dépend également de l'environnement et principalement du climat (température adéquate, pourcentage d'humidité, pluies, faible altitude). En général, il n'y a pas de transmission dans les centres-villes de grandes agglomérations, la transmission sévissant plutôt en périphérie et dans les zones rurales. De plus, les caractéristiques génétiques et immunitaires des populations exposées au paludisme influencent fortement la transmission du parasite (enfants de moins de 5 ans, mouvement de populations non immunisées, spécificité génétique conférant aux individus un facteur protecteur ou de gravité palustre, ...).

Ainsi, en fonction de ces critères, différentes zones d'endémicité palustre ont été définies :

Tableau 1 : Classification des zones d'endémicité palustre

Zones	Transmission	Prémunition	Prévalence à <i>P. falciparum</i> entre 2 et 9 ans	Type de paludisme
Holoendémique	Intense toute l'année	Solide	≥ 50%	Paludisme stable
Hyperendémique	Intense avec variation saisonnière	Significative		
Mésoendémique	Variable	Peu significative	Entre 11 et 50%	Paludisme instable
Hypoendémique	Faible	Nulle	≤ 10%	

4.1.1/ L'Europe

L'Europe est la première région au monde à être parvenue à éliminer le paludisme (25). Entre 1995 et 2015, le nombre de cas autochtones recensés est passé de 90 712 (principalement en Europe de l'Est) à 0 cas (26). Une surveillance accrue est encore en cours afin d'éviter une possible réintroduction du paludisme en Europe. Cependant, sous l'effet de la mondialisation et de la multiplication des échanges internationaux, des cas de paludismes d'importation ou d'aéroport sont toujours constatés.

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

4.1.2/ L'Afrique

L'Afrique, et principalement l'Afrique sub-saharienne, est le continent le plus largement touché par le paludisme, regroupant 90% des cas mondiaux de paludisme. Elle rassemble une très grande majorité des paludismes graves à *P. falciparum*, mais *P. ovale* et *P. malariae* (de manière plus sporadique) sont également présents. Si l'île de la Réunion ne présente aucun cas de paludisme autochtone, la maladie est néanmoins présente à Mayotte.

Le Bénin, situé en Afrique de l'Ouest, et qui constitue le site d'étude de mes travaux de thèse, présente un climat tropical chaud et humide avec une saison sèche et une saison des pluies favorable à la transmission palustre (environ 60 piqûres infestantes d'anophèles / homme / an) (27,28). Environ 97% des cas sont dus à *P. falciparum* et 2% à *P. malariae*. Dans ce pays, le paludisme est la 1^{ère} cause de consultation dans les centres de santé (40% des consultations chez les enfants de moins de 5 ans) (29). C'est également une des principales causes d'hospitalisation (environ 30%) et constitue 3% des décès chez les enfants de moins de 5 ans. L'incidence du paludisme est de 12% chez les adultes, 46% chez les enfants de moins d'un an et 22% chez les moins de 5 ans. Le neuropaludisme constitue la majorité des cas de paludisme chez les enfants avec une incidence d'environ 36% chez les moins d'un an et 19% chez les moins de 5 ans.

4.1.3/ L'Amérique

L'Amérique du Nord, y compris Saint-Pierre-et-Miquelon a réussi à éliminer le paludisme mais ce dernier reste encore présent en Amérique centrale où prédomine *P. vivax*. Dans les Antilles, le paludisme est absent de la Martinique et de la Guadeloupe mais reste présent en République Dominicaine et en Haïti. En Amérique du Sud, où sévit *P. falciparum* et *P. vivax*, le paludisme est retrouvé en bordure des cours d'eau et de la forêt Amazonienne, et notamment en Guyane française. En revanche il est absent aux abords de la Cordillère des Andes du fait de l'altitude trop élevée.

4.1.4/ L'Asie

L'Asie du Sud-Est est loin d'être exemptée de paludisme. Malgré un niveau de transmission plus faible qu'en Afrique sub-saharienne, *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. knowlesi* sont présents. De plus, cette zone est le berceau des mécanismes de résistance aux antipaludiques qui diffusent historiquement d'Est en Ouest. Cependant, en 2016, une cartographie mondiale de la résistance à l'artémisinine (étude KARMA) a confirmé qu'aucune résistance à cette molécule et ses dérivés n'a atteint l'Afrique, la résistance étant pour l'instant uniquement localisée en Asie du Sud-Est (30).

4.1.5/ L'Océanie

En Océanie, la présence de paludisme est variable en fonction des îles. L'Australie, la Nouvelle-Zélande, ainsi que la Nouvelle Calédonie, la Polynésie française et Wallis-et-Futuna sont indemnes de paludisme. D'autres îles en revanche présentent une forte transmission palustre comme la Papouasie-Nouvelle-Guinée.

4.1.6/ Le Proche et Moyen-Orient

Dans cette région, la transmission de *P. falciparum* ou de *P. vivax* varie d'un pays à l'autre. Si le paludisme est présent sur la côte ouest de la péninsule arabique et au Yémen, certains pays ne présentent que très peu de cas comme la Syrie ou les Emirats arabes unis et d'autres sont totalement indemnes comme le Liban ou la Jordanie.

4.2) Classification épidémiologique

Une classification des régions impaludées a été établie en se basant sur leur stabilité palustre : paludisme stable, intermédiaire ou instable. Il a également été défini des faciès

épidémiologiques du paludisme pour l'Afrique inter-tropicale, correspondant à un ensemble de lieux présentant une incidence, une prévalence, une stabilité palustre et un niveau de transmission similaires (31).

4.2.1/ Paludisme stable

* *Le faciès équatorial* : correspond à des zones forestières et savanes post-forestières d'Afrique centrale. La transmission est très intense (environ 1000 piqûres infectantes / personne / an) et dure toute l'année. La très grande majorité des habitants de ces régions présente une parasitémie ainsi qu'une forte prémunition dès l'âge de 5 ans.

* *Le faciès tropical* : correspond à des zones de savanes humides. La transmission est intense (environ 100 à 400 piqûres infectantes / personne / an) avec quelques variations saisonnières et une prémunition observée vers l'âge de 10 ans. Le Bénin peut être inclus dans ce faciès.

4.2.2/ Paludisme intermédiaire

* *Le faciès sahélien* : correspond à des zones de savanes sèches. La transmission y est plus variable et saisonnière (environ 2 à 20 piqûres infectantes / personne / an), et la prémunition plus longue à se développer.

4.2.3/ Paludisme instable

* *Le faciès désertique, le faciès austral* (correspondant à des plateaux du sud-africains) *et le faciès montagnard* (correspondant à des zones à plus de 1000 mètres d'altitude) : la transmission est faible et courte et aucune prémunition ne s'établit. Ainsi, de fortes épidémies sont observées chez l'ensemble de la population lors des pics de transmission.

V – PHYSIOPATOLOGIE ET SYMPTOMATOLOGIE

1. Physiopathologie générale

Après une phase hépatique, le parasite envahit les GR de l'homme. Pour se développer, il utilise les ressources de l'hôte en consommant et dégradant notamment l'hémoglobine. La membrane du GR infecté (GRi) est alors altérée. Sa morphologie et sa composition changent. De plus, le GRi exprime à sa surface des protéines parasitaires appelées antigènes variants de surface (VSA), notamment la protéine PfEMP1 (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1) codée par une famille de 60 gènes *var* et localisée au niveau de protubérances appelées knobs (32,33). Le GRi présente ainsi un contour irrégulier, plus antigénique et moins déformable.

De par ses 60 gènes, PfEMP1 présente une variabilité antigénique qui rend la tâche complexe à la réponse immune pour la production d'anticorps (AC) spécifiques efficaces. Ces protéines conditionnent la virulence du parasite et leur localisation dans les différents organes. Elles participent à la séquestration des hématies infectées dans les organes profonds (cerveau, rate, foie) en interagissant avec les récepteurs membranaires des cellules endothéliales tapissant les vaisseaux sanguins. Après multiplication du parasite dans l'hématie, celle-ci éclate, induisant une hémolyse et libérant les mérozoïtes qui iront infecter de nouvelles hématies, mais également le pigment malarique (ou hémozoïne), des facteurs parasitaires, des glycoprotéines et glycolipides (GPI), etc...

2. Facteurs humains de sensibilité à l'infection

2.1) La réponse immunitaire de l'hôte

L'homme ne développe jamais d'immunité totale pour le paludisme. Cependant, avec l'âge, et à force d'exposition régulière au parasite, les populations vivant dans des zones de forte endémie palustre développent une certaine immunité protectrice, acquise et partielle, face au parasite, on appelle cela la prémunition. Cette dernière s'acquiert au bout de plusieurs années

d'exposition et dépend des espèces plasmodiales et de la fréquence des piqûres (22,34). Elle n'empêche pas de contracter la maladie (elle est dite non stérilisante) mais permet à l'organisme de lutter plus rapidement et plus efficacement contre l'infection et ainsi de développer des formes palustres moins graves. Les adultes vivant en zone d'endémicité palustre peuvent être asymptomatiques, portant des parasites de *Plasmodium* et préservant sa transmission et sa dissémination dans la population (35). Il s'agit donc d'une immunité contre la maladie mais pas contre le parasite lui-même. Cette prémunition disparaît lors d'un arrêt de l'exposition aux piqûres. Le risque est donc important pour les émigrés ayant effectué un séjour hors d'une zone endémique (1 à 2 ans) et qui reviennent dans une zone de transmission palustre. De même, les enfants âgés de 6 mois à 6 ans n'ont pas encore développé cette immunité acquise et sont donc plus vulnérables aux accès palustres graves (23). Les nouveau-nés sont quant à eux protégés par les anticorps maternels durant les 6 premiers mois de leur vie. Enfin, durant la grossesse, la prémunition est partiellement perdue.

La prémunition s'explique en partie par la production d'AC ciblant les antigènes (Ag) parasitaires de *Plasmodium* et principalement ceux situés à la surface du GRi. Ces Ag possèdent une grande variabilité génétique permettant ainsi au parasite d'échapper aux réponses immunitaires de l'hôte. Les protéines les plus étudiées sont la PfEMP1, la protéine Rific qui serait responsable du phénomène de rosetting, les protéines de surface du mérozoïte (MSP1, MSP2, MSP3) jouant un rôle essentiel lors de l'invasion des GR par le parasite, et le circumsporozoïte (CSP) retrouvé à la surface des sporozoïtes et favorisant la cytoadhérence du parasite aux cellules hépatiques ou stomacales du moustique (11).

Les AC peuvent agir à différents niveaux : 1/ directement sur les Ag parasitaires, (comme MSP1) empêchant alors l'adhésion et/ou l'internalisation du parasite dans le GR, 2/ en perturbant le développement du parasite à l'intérieur du GR via des transporteurs, 3/ en agissant avec d'autres éléments du système immunitaire, notamment les leucocytes.

Ils jouent un rôle majeur dans la résolution de l'infection palustre. En effet, des expériences ont montré qu'une forte réduction de parasitémie et des manifestations cliniques est constatée après transfert d'Immunoglobulines G (IgG) à des enfants atteints de paludisme (36). Les IgG1 et IgG3, ciblant les protéines MSP1 et MSP2, ont déjà montré leur importance lors de la lutte contre l'infection palustre (37). En effet, ces IgG1 et IgG3 jouent un rôle dans le mécanisme d'opsonisation nécessaire à la résolution de l'infection (38). En revanche les IgG2 et IgG4 semblent bloquer cette opsonisation et joueraient donc un rôle délétère (39,40). Un taux élevé d'IgE a également été corrélé à une mauvaise évolution clinique (41,42).

2.2) Facteurs génétiques

Certains facteurs génétiques jouent un rôle déterminant dans la pathologie palustre et confèrent aux individus concernés une réponse immunitaire naturelle mais partielle contre le paludisme. Les principales anomalies génétiques liées au GR sont détaillées ci-dessous :

* *Drépanocytose* :

La drépanocytose, ou anémie falciforme, est caractérisée par une forme anormale de l'hémoglobine (HbS), qui va se cristalliser et conduire à une déformation des GR qui adopteront une forme plus allongée. Le parasite a ainsi plus de difficulté à pénétrer et se développer correctement à l'intérieur des hématies. Les personnes portant la mutation homozygote S/S sur le gène de l'Hb présentent une maladie chronique grave, alors que les porteurs de la mutation hétérozygote (A/S) sont asymptomatiques. Le trait drépanocytaire (A/S) est associé à une protection partielle du paludisme, en particulier des formes graves (43,44).

* *Déficit en Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase (G6PD) et paludisme* :

Le déficit en G6PD, ou favisme, participe à la résolution de l'infection palustre en luttant contre le stress oxydant dans les globules rouges. Un déficit enzymatique permettrait donc une évolution clinique favorable (45).

* *Groupe sanguin et paludisme* : Des études ont mis en évidence que le groupe sanguin O apporterait une certaine protection contre le paludisme grave (46,47).

* *Système immunogène Duffy et paludisme* :

En Afrique, certaines personnes portent le gène Duffy négatif, c'est-à-dire que leurs GR ne présentent pas à leurs surfaces la molécule du groupe Duffy nécessaire à la pénétration du parasite, ils sont alors résistants à *P. vivax* (48). Cela explique alors la forte proportion de ces populations en Afrique mais également l'absence de *P. vivax* dans ces zones de forte endémicité palustre.

3. Tableaux cliniques et biologiques

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

3.1) Accès palustre simple

C'est la forme clinique la plus fréquente qui se définit par un diagnostic positif (voir les différents types de diagnostic, chapitre VI-Diagnostic) et l'expression de manifestations cliniques palustres sans complications.

Le tableau clinique est assez variable et non spécifique au paludisme. Un paludisme simple débute par une forte fièvre pouvant dépasser 40°C et est souvent associé à un syndrome pseudo-grippal avec apparition de céphalées, myalgies, troubles digestifs (douleur abdominale, vomissement, diarrhée). Une hépatosplénomégalie (augmentation du volume du foie et de la rate due à une forte activité phagocytaire) est parfois observée, tout comme une coloration foncée des urines traduisant une hémoglobinurie. Une thrombopénie ainsi qu'une anémie et parfois une leucopénie sont des signes biologiques fréquemment rencontrés, de même qu'un syndrome inflammatoire, une hémolyse ainsi qu'une cytolysse hépatique.

Avec la synchronisation du cycle intra-érythrocytaire et l'éclatement des GR, la fièvre initialement continue évolue et devient une fièvre périodique avec des pics fébriles. Ces pics sont caractérisés par l'enchaînement de différents symptômes qui sont généralement identiques chez un même malade : début brutal puis frisson (fièvre > 39°C, dure 1h), chaleur (fièvre > 40°C, dure 3-4h) et sueur et hypothermie (baisse de la température, dure 2-4h) puis euphorie. Selon les espèces de *Plasmodium*, la chronicité des pics fébriles n'est pas la même. En effet, on observe une fièvre tierce (J1-J3-J5-J7) avec *P. falciparum*, *vivax* et *ovale* (cycle de 48h) et une fièvre quarte (J1-J4-J7-J10) avec *P. malariae* (cycle de 72h). *P. knowlesi* présente quant à lui une fièvre quotidienne (cycle de 24h).

A ce stade de l'infection, les tableaux cliniques et biologiques sont non spécifiques et ne permettent pas de connaître l'évolution de la pathologie. Or, la plupart des accès graves de paludisme débute par un accès simple qui évolue vers des complications. Si elle n'est pas diagnostiquée rapidement et traitée correctement, une infection à *P. falciparum* évolue en infection mortelle, et un paludisme grave traité reste fatal dans environ 20 à 30% des cas (3).

C'est pour cela que le diagnostic du paludisme est une urgence médicale : toute fièvre chez un patient de retour d'une zone d'endémie palustre est un paludisme jusqu'à preuve du contraire.

3.2) Accès palustres graves à *P. falciparum*

Les accès palustres graves, définis par la défaillance d'un organe vital ou par l'infection du placenta, sont majoritairement dus à *P. falciparum*. Quelques cas de paludisme sévère à *P. vivax*

et *P. knowlesi* ont néanmoins été observés (16,17). Une infection palustre provoquée par *P. ovale* ou *P. malariae* peut causer des complications sévères mais met rarement en danger la vie des patients. Les individus les plus à risque sont ceux qui n'ont pas développé d'immunité spécifique contre les parasites, c'est-à-dire : les enfants de moins de 5 ans, les migrants et les voyageurs non immunisés, les personnes immunodéprimées dont les porteurs du VIH, et les femmes enceintes primipares. La survenue d'accès palustres graves peut s'expliquer par différents facteurs : la diversité génétique et immunitaire de l'homme et du parasite, mais également les facteurs sociaux (accès aux soins) et environnementaux (niveau de transmission).

L'OMS a défini les critères précis du paludisme grave, servant de base aux recherches épidémiologiques. Par définition, un paludisme grave non placentaire est caractérisé par la présence de formes parasitaires asexuées et la présence d'un ou plusieurs des critères suivants (4,14) :

- Troubles de la conscience : score de Glasgow < 11 (chez l'adulte) et un score de Blantyre (SB) < 3 (chez l'enfant)
- Défaillance neurologique : obnubilation, confusion, somnolence, prostration (faiblesse généralisée : patient incapable de s'asseoir, de se tenir debout, de marcher sans assistance)
- Convulsions répétées (> 2 épisodes en 24h)
- Défaillance respiratoire : $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ mmHg (si ventilation mécanique) et $\text{PaO}_2 < 60$ mmHg et/ou $\text{SpO}_2 < 90\%$ en air ambiant et/ou polypnée $> 32/\text{min}$ (si non ventilé), signes radiologiques
- Acidose : bicarbonate plasmatique < 15 mmol/l ou acidémie avec $\text{pH} < 7,35$
- Hyperlactatémie : lactate > 5 mmol/l
- Hypoglycémie : glucose sanguin ou plasmatique $< 2,2$ mmol/l
- Anémie sévère : $\text{Hb} \leq 5$ g/dl ou un hématoците $\leq 15\%$ chez l'enfant de moins de 12 ans et une $\text{Hb} \leq 7$ g/dl ou un hématoците $\leq 20\%$ chez l'adulte, avec une densité parasitaire (DP) $> 10\,000/\mu\text{l}$ de sang
- Lésion rénale aiguë : créatinine plasmatique ou sérique > 265 $\mu\text{mol/l}$ ou urée sanguine > 20 mmol/l
- Hémoglobinurie
- Ictère clinique : bilirubine plasmatique ou sérique > 50 $\mu\text{mol/l}$ avec une DP $> 100\,000/\mu\text{l}$ de sang
- Anomalies hémorragiques

- Collapsus circulatoire ou choc, tension artérielle systolique < 80 mm Hg chez l'adulte et < 50 mm Hg chez l'enfant
- Hyperparasitémie : parasitémie à *P. falciparum* > 10% (soit environ 400 000/μl de sang)

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

Le tableau clinique et biologique du paludisme grave est différent entre l'adulte et l'enfant. Il est nécessaire pour le personnel soignant de bien les identifier afin de pouvoir améliorer le diagnostic et la prise en charge rapide de leurs patients (Tableau 2).

Tableau 2 : Signes et symptômes du paludisme grave chez l'adulte et l'enfant (Prise en charge du paludisme grave, Guide pratique, OMS, 2013)

Signe ou symptôme	Adulte	Enfant
Durée de la maladie	5-7 jours	Plus courte (1-2 jours)
Détresse respiratoire/ Respiration profonde (acidose)	Fréquente	Fréquente
Convulsions	Fréquentes (12 %)	Très fréquentes (30 %)
Hypertonies (rigidité de décortication/ décérébration/ attitude en opisthotonos)	Peu fréquentes	Fréquentes
Prostration/obnubilation	Fréquente	Fréquente
Disparition du coma	2-4 jours	Rapide (1-2 jours)
Séquelles neurologiques après un neuropaludisme	Peu fréquentes (1 %)	Fréquentes (5-30 %)
Ictère	Fréquent	Peu fréquent
Hypoglycémie	Moins fréquente	Fréquente
Acidose métabolique	Fréquente	Fréquente
Œdème pulmonaire	Peu fréquent	Rare
Insuffisance rénale	Fréquente	Rare
Pression d'ouverture lors de la ponction lombaire	Normale en général	Augmentée en général
Troubles du saignement/de la coagulation	Jusqu'à 10 %	Rares
Infection bactérienne invasive (co-infection)	Peu fréquente (< 5 %)	Fréquente (10 %)

^a D'après des études sur des adultes et des enfants en Asie du Sud-Est et des enfants africains.^{6,7}

3.2.1/ Neuropaludisme

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

3.2.2/ Anémie sévère palustre

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

3.2.3/ Autres types d'accès palustres graves

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

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

3.2.4/ Paludisme viscéral évolutif = paludisme chronique

Cette forme clinique touche principalement les personnes insuffisamment prémunies et exposées de façon répétée au parasite (enfants des zones d'endémie, expatriés avec une chimioprophylaxie inefficace), ou présentant des souches résistantes à la chloroquine. Elle est caractérisée par une fièvre modérée, associée à une anémie, une dyspnée, une splénomégalie et une cytopénie. Elle correspond à un emballement des défenses de l'hôte détruisant les parasites et les cellules et tissus humains. Si elle est correctement traitée, son évolution est favorable.

3.2.5/ Fièvre bilieuse hémoglobinurique

Cette forme clinique due à *P. falciparum* reste rare. Elle est la conséquence d'une mauvaise prise de quinine (mésusage d'une chimioprophylaxie à base de quinine par exemple) et conduit à une hémolyse intravasculaire brutale et donc à une anémie profonde. Elle est caractérisée par un état de prostration et des lombalgies, associés à une forte fièvre, un ictère hémolytique, des urines foncées (forte hémoglobinurie) puis à une anurie (blocage rénal). Les conséquences peuvent être dramatiques avec un coma et une insuffisance rénale conduisant au décès du patient dans environ 30% des cas.

3.2.6/ Paludisme de la femme enceinte

Le paludisme de la femme enceinte ou paludisme placentaire ou paludisme gestationnel, est considéré comme un paludisme grave que la femme présente ou non des symptômes de gravité, étant donné le risque encouru pour la mère et l'enfant. Les conséquences les plus fréquentes sont un faible poids à la naissance du nouveau-né et une anémie sévère chez la mère pendant la grossesse. Il est également responsable d'avortements spontanés, d'accouchements prématurés et d'enfants mort-nés. L'anémie sévère chez la mère en fin de grossesse est fréquemment associée à un risque accru d'hémorragie lors de l'accouchement et donc à l'augmentation de la mortalité périnatale. Une hypoglycémie et un œdème pulmonaire sont des signes récurrents, de même que l'augmentation des risques de co-infection et de complications obstétricales. Une surveillance étroite est recommandée pour éviter toute aggravation clinique.

La séquestration massive de *P. falciparum* dans le placenta pourrait considérablement affecter les échanges entre la mère et le fœtus, et expliquer la fréquence des faibles poids de naissance au sein des enfants nés de mères infectées. La mortalité due au paludisme durant la grossesse est d'environ 50%. Les femmes primipares ont plus de risque de développer un paludisme que les multipares.

VI – DIAGNOSTIC

La période d'incubation de la maladie, cliniquement asymptomatique, correspond au cycle hépatique du parasite chez l'homme. Le diagnostic est donc lié au cycle intra-érythrocytaire et à l'apparition des premières manifestations cliniques.

Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques. Un diagnostic rapide est essentiel pour une prise en charge efficace du patient et ainsi éviter des possibles complications.

1. Diagnostic de présomption

1.1) Interrogatoire du patient : Séjour en zone d'endémie

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

1.2) Examen clinique

Le tableau clinique du paludisme (fièvre, syndrome pseudo-grippal, hépato-splénomégalie, complications neurologiques, ...) n'est pas spécifique de cette maladie et s'apparente à beaucoup d'autres pathologies (grippe, infection du système nerveux, méningite, septicémie, pneumonie, d'autres parasitoses, ...). Le diagnostic clinique est donc assez difficile et nécessite de prendre en compte l'ensemble des potentiels diagnostics différentiels (autres causes de fièvre au retour d'une zone inter-tropicale ou étiologies de fièvres aiguës).

1.3) Examen biologique : NFS

Bien que peu spécifiques, différents signes biologiques peuvent orienter le diagnostic vers une infection palustre, les principaux sont décrits ci-dessous :

- Une thrombocytopenie (plaquettes $< 150\ 000/\text{mm}^3$) traduisant une séquestration des plaquettes dans les capillaires sanguins, très fréquente lors d'une infection par *P. falciparum* et beaucoup moins pour les autres espèces.

- Une anémie progressive, apparaissant seulement lors de la synchronisation du cycle avec l'éclatement simultané des GR libérant alors de forte quantité d'hémoglobine.
- Une hémoglobinurie
- Une leucopénie ou leucocytose
- Un syndrome inflammatoire correspondant à une augmentation de la CRP (Protéine C-Réactive)

2. Diagnostic de certitude

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

2.1) Examens microscopiques

L'examen microscopique est la technique de référence pour le diagnostic du paludisme. Il existe deux méthodes complémentaires : le frottis sanguin (FS) et la goutte épaisse (GE) (Figure 6). Ces deux méthodes nécessitent les compétences d'un biologiste qualifié et la présence de matériel adéquat (microscope, lame, produit de coloration). Si le diagnostic s'avère négatif, la lecture doit être répétée afin de limiter les faux négatifs. La surveillance de la DP en début de traitement est essentielle afin d'évaluer l'efficacité du médicament antipaludique administré et identifier de potentielles résistances.

* *Le frottis mince* : Une goutte de sang du patient est étalée sur une lame de microscope puis colorée au May Grünwald Giemsa (MGG). Cette technique permet de mesurer la DP du patient et a l'avantage de pouvoir établir un diagnostic d'espèce en identifiant les différentes formes parasitaires présentes au microscope à immersion. Les parasites sont en effet visibles à l'intérieur du GR ce qui permet de distinguer les éventuelles granulations caractéristiques des espèces.

* *La goutte épaisse* : C'est une technique de micro-concentration qui permet une meilleure limite de détection (identification du parasite même en cas de faible parasitémie) mais n'est pas idéale pour le diagnostic d'espèce car les GR sont éclatés (lecture après hémolyse) et les parasites extracellulaires.

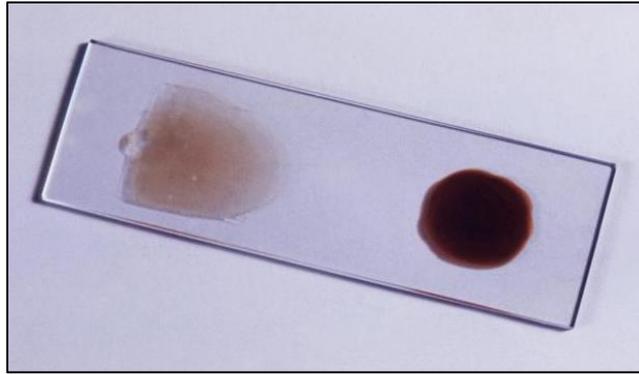


Figure 6 : Frottis sanguin (à gauche) et goutte épaisse (à droite). (CIRAD)

2.2) Le test de diagnostic rapide, ou TDR

Ce test est facile à effectuer, rapide et fiable. Il consiste à rechercher des Ag plasmodiaux circulants. Ainsi, ces tests ne sont pas utilisés pour surveiller et évaluer l'efficacité du traitement administré au patient car ils peuvent se révéler positifs jusqu'à 4 semaines après l'élimination des parasites. Les TDR ne remplacent pas la mise en évidence directe des parasites et leur comptage par FS/GE mais offrent un diagnostic qualitatif rapide dont la sensibilité est supérieure à celle de la microscopie, directement liée à l'expérience du technicien. Il présente également l'avantage d'une réalisation facile sans matériel particulier.

Les TDR utilisent une technique d'immunochromatographie : ils sont réalisés sur bandelette à l'aide d'un AC monoclonal (Figure 7).

Dans la majorité des cas, les TDR visent l'antigène HRP-2 (Histidin-Rich-Protein 2) spécifique de *P. falciparum* qui a la propriété de disparaître lentement de l'organisme. D'autres TDR ciblent des enzymes parasitaires, ou d'autres protéines plasmodiales telles que la pLDH (*Plasmodium* lactate deshydrogenase) ou l'aldolase. La grande majorité des TDR s'orientent spécifiquement vers le diagnostic de *P. falciparum* mais il en existe d'autres permettant de détecter les autres espèces plasmodiales et notamment *P. vivax*.

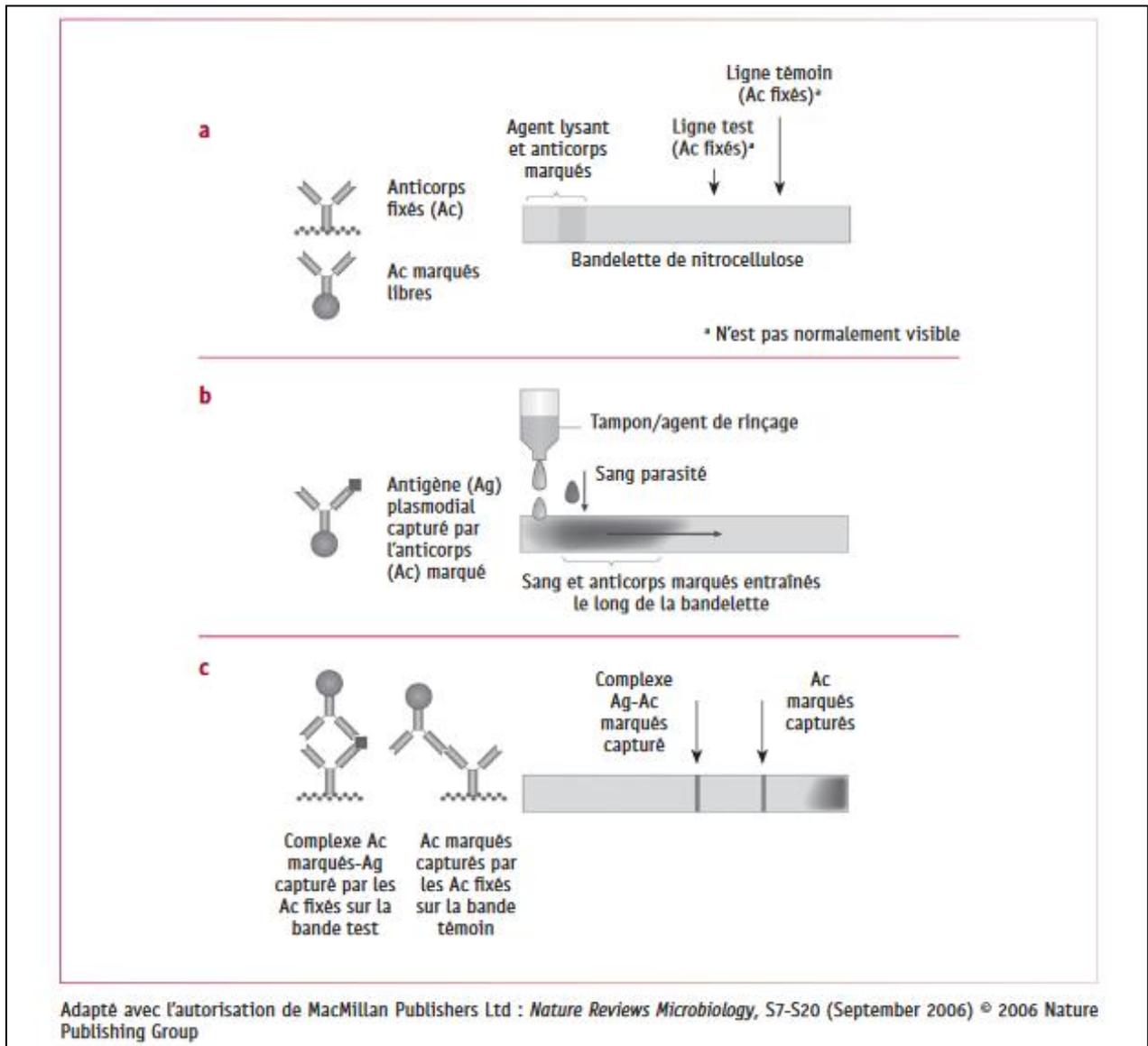


Figure 7 : Principe d'un Test de Diagnostic Rapide (TDR) du paludisme. (« Bonnes Pratiques relatives au choix et à l'achat des tests de diagnostic rapide du paludisme », OMS, 2012)

2.3 La PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique d'amplification génique a l'avantage de présenter de très fortes sensibilité (supérieure à 90%) et spécificité (quasiment 100%), permettant la détection de *Plasmodium* mêmes lors de très faibles parasitémies. Elle est particulièrement utile pour évaluer les résistances et pour des recherches épidémiologiques mais n'est pas effectuée en routine pour le diagnostic d'urgence car son délai de réalisation est trop long et coûteux, nécessitant un équipement sophistiqué de biologie moléculaire et du personnel de laboratoire formé.

3. Diagnostic sérologique

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

VII – TRAITEMENTS

Plasmodium est le seul parasite qui doit être traité en urgence car son évolution est difficilement prévisible et peut rapidement engager le pronostic vital du malade. Il est donc nécessaire de mettre en place rapidement un traitement efficace et adapté au patient et à la forme clinique. La prise en charge en ambulatoire constitue la majorité des cas en zone d'endémie, les accès simples étant très fréquents. L'apparition de symptômes de gravité nécessite en revanche l'hospitalisation du patient.

1. Classification des principaux antipaludiques

Le Tableau 3 présente les principales molécules antipaludiques actuellement recommandées par l'OMS. Tous les antipaludiques doivent être délivrés sur prescription médicale. Ils sont à prendre pour la grande majorité au cours du repas ou avec une boisson lactée afin d'améliorer leur biodisponibilité.

1.1) Les schizonticides érythrocytaires

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

1.1.1/ Amino-4-quinoléines

Mécanisme d'action : Inhibition de la détoxification de l'hème de l'Hb conduisant à une accumulation d'hématine (produit de dégradation de l'hème toxique pour le parasite).

Molécules : *Chloroquine (NIVAQUINE®), Amodiaquine, Pipéraquline*

1.1.2/ Arylamino alcool

Mécanisme d'action : Inhibition de la détoxification de l'hème de l'Hb conduisant à une accumulation d'hématine (produit de dégradation de l'hème toxique pour le parasite).

Molécules : *Quinine (QUININMAX®), Méfloquine (LARIAM®), Luméfántrine, Halofántrine (HALFAN®, retiré du marché en mars 2016)*

1.1.3/ Dérivés de l'artémisinine

Ces médicaments jouent sur la libération de radicaux libres toxiques pour le parasite. Ils agissent contre tous les stades parasitaires intra-érythrocytaires mais également sur les gamétocytes permettant alors de limiter la transmission des parasites chez le moustique.

Molécules : *Artemether* (ARTESIANE®), *Artesunate* (ARINATE®), *Dihydro-artemisinine* également appelé *Arténimol* (ALAXIN®) : métabolite actif de l'artésunate et de l'artéméther

1.1.4/ Antifoliques

Ces médicaments agissent au niveau de la voie de synthèse des folates nécessaires à la production d'acides nucléiques par le parasite.

Molécule : *Sulfadoxine* (FANASIL®)

1.1.5/ Antifoliniques

Ces médicaments agissent également au niveau de la voie de synthèse des folates nécessaires à la production d'acides nucléiques par le parasite.

Molécules : *Pyriméthamine* (MALOCIDEA®), *Proguanil* (PALUDRINE®)

1.1.6/ Analogue de l'ubiquinone

Mécanisme d'action : Agit sur tous les stades et sur toutes les espèces de *Plasmodium* infectant l'homme. Elle inhibe le transport de la dihydroorotate déshydrogénase, enzyme essentielle au fonctionnement de la chaîne de transfert des électrons de la mitochondrie.

Molécule : *Atovaquone*

1.1.7/ Antibiotiques

Molécules : *Doxycycline* (DOXUPALU®), *Clindamycine* (DALACINE®)

1.2) Les gamétocytocides

Primaquine (PRIMAQUINE®) : Médicament actif contre les formes exo-érythrocytaires de *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* mais également sur les gamétocytes de *P. falciparum*. Utilisé en traitement préventif de la rechute du paludisme à *P. vivax* et *P. ovale*.

1.3) Les bithérapies

Jusque dans les années 2000, les traitements étaient adaptés au niveau de résistance des parasites dans une zone donnée. Aujourd'hui étant donné l'ampleur mondiale de la résistance

des parasites de *P. falciparum* à la plupart des molécules, l'OMS recommande l'usage de bithérapies et principalement de CTA (combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine) dans le monde entier. Ces associations de médicaments permettent d'augmenter l'efficacité du traitement et de lutter contre l'émergence de nouvelles résistances.

1.3.1/ Les CTA (Combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine)

Ces médicaments sont caractérisés par un dérivé d'artémisinine à action rapide et d'une autre molécule d'une durée d'action plus longue. L'artémisinine permet d'éliminer rapidement les parasites présents dans le sang et donc de diminuer fortement la parasitémie. La molécule associée permet d'éliminer les parasites restants et de prévenir de potentielles résistances.

Molécules : *Artésunate/Méfloquine (ARTEQUIN®)*, *Artemether/Luméfantrine (COARTEM®, RIAMET®)*, *Dihydroartémisinine/Pipéraquline (EURARTESIM®)*, *Artésunate/Amodiaquine (ARSUCAM®)*, *Artésunate/Sulfadoxine/pyriméthamine*

1.3.2/ Autres bithérapies actuellement recommandées

Molécules : *Atovaquone/Proguanil (MALARONE®) utilisé essentiellement en prophylaxie*, *Sulfadoxine/Pyriméthamine (FANSIDAR®)*

Tableau 3 : Principales molécules antipaludiques actuellement recommandées par l'OMS

Molécules	Posologie et voie d'administration	Indications	Pharmacocinétique	Effets secondaires	Précautions d'emploi
Chloroquine	<i>Per os</i> 10mg/kg les 1 ^{er} et 2 ^{ème} jours, 5 mg/kg le 3 ^{ème} jour (soit 25mg/kg de dose totale)	Traitement du paludisme simple à <i>P. vivax, ovale, malariae</i> , et <i>knowlesi</i> , Non recommandé en chimioprophylaxie contre <i>P. falciparum</i> mais peut être utilisé pour prévenir les infections à <i>P. vivax</i> .	Bonne biodisponibilité <i>Per os</i> , bonne distribution tissulaire, 60% de LPP, métabolisation hépatique, t ½ élimination longue (20-60 jours), élimination à 50% par voie rénale	Rares et bénins (hématologiques, neurologiques, digestifs, prurit) Surdosage : rétinopathies	Sujet présentant un psoriasis, des troubles visuels ou rénaux
Méfloquine	<i>Per os</i> 24mg/kg répartis en 2 à 3 prises en moins de 24h (les prises pouvant être espacées de 6 à 12h)	Traitement prophylactique du paludisme dans les zones chimiorésistantes. Traitement du paludisme simple à <i>P. falciparum, vivax, ovale</i> et <i>P. malariae</i>	Absorption orale > 85%, pic de concentration en 6-24h, t ½ vie longue, bonne distribution tissulaire et dans les hématies, 98% de LPP, convertit en métabolite inactif, t ½ élimination de 2-4 semaines, élimination biliaire et fécale	Digestifs, Neuro-psychiatriques (cauchemars, dépression, insomnie, céphalées, vertiges), troubles oculaires	CI : allaitement, enfant < 15kg, ATCD de convulsions ou troubles psychiatriques, insuffisance hépatique IAM : un traitement par quinine ne doit pas être associé ni suivre immédiatement une prise de Méfloquine (risque d'allongement de l'intervalle QT)
Quinine	t ½ vie courte Dose de charge : 20 mg/kg perfusée en 4h dans du sérum glucosé Dose d'entretien : 10 mg/kg toutes les 8h (début 4h après la dose de charge) Durée totale du traitement : 7 jours, relais <i>per os</i>	Traitement du paludisme simple en particulier si résistance aux Amino-4-quinoléines. Non recommandée en chimioprophylaxie	Absorption quasi complète par voie digestive, pic de concentration en 1-3h, 70% de LPP, métabolisation hépatique (métabolite inactif), élimination urinaire	Digestifs, visuels (troubles de l'accommodation), céphalées Rarement : hypoglycémie Si surdosage : troubles cardiorespiratoires graves	Sujet âgé, cardiopathie sous-jacente, hypokaliémie, prise concomitante d'un médicament allongeant l'espace QT, d'un diurétique ou antidépresseur CI : ATCD de fièvre bilieuse hémoglobinurique, hypersensibilité, troubles

	possible à partir de 72h				du rythme ou de conduction graves IAM : traitement antérieur par Mefloquine
Artésunate	IV, <i>Per os</i> , IM, voie rectale 2,4 mg/kg à H0-H12-H24, puis toutes les 24h, Vitesse d'injection : 3ml/min Administration de maximum 9 doses. Relais PO possible après 3 doses minimum	Traitement de 1 ^{ère} intention du paludisme grave (IV ou IM), Traitement de pré-transfert de 1 ^{ère} intention du paludisme grave (voie rectale), Traitement du paludisme simple à <i>P. falciparum, vivax, ovale, malariae, et knowlesi</i> (en association soit avec l'Amodiaquine, la Mefloquine, ou la Sulfadoxine-Pyriméthamine)	Hydrosoluble, absorption rapide, 93% de LPP, métabolisation par les estérases plasmatiques et les CYP 2A4, élimination rapide dans les urines	Bien toléré. Rare : anémie, hépatotoxicité et neurotoxicité, rash, bradycardie transitoire et allongement du QTc	Sujets présentant une atteinte rénale et/ou hépatique
Doxycycline	<i>Per os</i> 100mg/12h	Traitement prophylactique du paludisme, Traitement du paludisme simple (toujours en association), Traitement de relais du paludisme grave (en association avec la Quinine ou l'Artésunate)	Très lipophile, absorption rapide. Ne pas prendre avec une boisson lactée (diminution de l'absorption), largement distribuée dans les tissus et fluides de l'organisme, 90% de LPP, se concentre dans la bile, éliminé à 40% dans les urines	Phototoxicité, ulcération œsophagiennes, troubles digestifs et cutanés, décoloration des dents chez les enfants Plus graves et rares : troubles hématologiques	Sujets présentant des troubles digestifs (risque de colite pseudo-membraneuse) CI : enfant < 8ans (décoloration des dents), grossesse (risque de nécrose hépatique, retard de croissance du fœtus)
Atovaquone - Proguanil	<i>Per os</i> Cpm de 250mg/100mg	Traitement prophylactique du paludisme, Traitement du paludisme simple chez les voyageurs rentrés d'une zone d'endémie palustre, Traitement alternatif du paludisme grave	Très lipophile, biodisponibilité faible, LPP forte, élimination hépatique et biliaire et t _{1/2} élimination de 2-3 jours pour l'Atovaquone,	Digestifs (douleurs abdominales, nausées, vomissements), céphalées, troubles de la circulation, rash, anémie, anorexie	CI : Insuffisance rénale sévère (risque de pancytopenie lors d'une prise régulière en traitement prophylaxique)

	4 cpm en 1 prise/jour pendant 3 jours		métabolisation hépatique et élimination urinaire pour le Proguanil		
Artémether - Luméfantrine	<i>Per os</i> Cpm de 20mg/120mg 4 cpm en 6 prises (H0-H8-H24-H36-H48-H60)	Traitement du paludisme simple à <i>P. falciparum, vivax, ovale, malariae, et knowlesi</i> , Traitement en relais per os lors de paludismes graves. Non recommandée en chimioprophylaxie Artemether seul : Traitement de 2 ^{de} intention du paludisme grave (voie IM), Traitement de pré-transfert de 2 ^{de} intention du paludisme grave	Pic de concentration atteint en 2h pour l'artémether et 6-8h pour la luméfantrine, LPP > 95%, artemether rapidement métabolisé en dihydro-artémisinine, t ½ élimination de 2h pour l'artémether et de 2-6 jours pour la luméfantrine,	Digestifs, perte d'appétit, troubles du sommeil, céphalées, rash Rares : cardiaques (palpitation, allongement de l'intervalle QT), troubles électrolytiques	Sujets âgés et enfants < 5kg Insuffisances hépatique et rénale sévères CI : 1 ^{er} trimestre de grossesse, allongement du QT, déséquilibres électrolytiques
Dihydro-artémisinine-pipéraquline	<i>Per os</i> Cpm de 40/mg/320mg 2 à 4 cpm/jour en 1 prise pendant 3 jours	Traitement du paludisme simple à <i>P. falciparum, vivax, ovale, malariae, et knowlesi</i> , Traitement en relais per os lors de paludismes graves	Absorption rapide pour l'arténimol et lente pour la pipéraquline, ne pas prendre au cours d'un repas gras, LPP forte, métabolisation hépatique, t ½ élimination de 1h pour l'arténimol et de 2-4 semaines pour la pipéraquline	Digestifs, céphalées, allongement de l'intervalle QT, tachycardie, anémie, asthénie, toux	Sujets âgés et enfants < 5kg Insuffisance hépatique et rénale sévères CI : 1 ^{er} trimestre de grossesse, allongement du QT, déséquilibres électrolytiques

Per os = voie orale ; IV = voie intra-veineuse ; IM = voie intra-musculaire ; cpm = comprimé

LPP = liaison aux protéines plasmatiques

CI = contre-indication ; IAM = interaction médicamenteuse

2. Traitement du paludisme à *P. falciparum*

2.1) Traitements des formes simples

2.1.1/ Chez l'adulte et l'enfant (figure 8)

Le traitement de 1^{ère} intention des accès palustre simples à *P. falciparum* consiste à administrer, durant 3 jours, une CTA par voie orale chez les patients de plus de 5 kg. Cinq CTA sont actuellement recommandées :

* Arthémether-Luméfantine

Comprimés de 20mg/120mg

Adulte et enfant > 12ans et >25kg : 6 prises de 4 cpm (H0-H8-H24-H36-H48 et H60)

Enfant entre 5 et 35kg : 6 prises de 1 à 3 cpm en 3 jours (en fonction du poids de l'enfant)

* Artésunate-Amodiaquine

Comprimés de 25mg/67,5mg

Adulte et enfant >36kg : 4 cpm/jour pendant 3 jours

Enfant entre 5 et 36kg : 1 à 3 cpm/jour pendant 3 jours (en fonction du poids de l'enfant)

* Artésunate-Méfloquine

Adulte et enfant > 30kg : Comprimés de 100mg/220mg, 2cpm/jour pendant 3 jours

Enfant entre 5 et 30kg : Comprimés de 25mg/55mg, 1 à 4 cpm/jour pendant 3 jours

* Dihydroartémisine-Pipéraquline

Adulte et enfant > 25kg : Comprimés de 40mg/320mg, 2 à 4 cpm/jour pendant 3 jours

Enfant entre 5 et 25kg : Comprimés de 20mg/160mg, minimum 2,5 mg/kg/jour de dihydroartémisine et 20 mg/kg/jour de pipéraquline pendant 3 jours

* Artésunate-Sulfadoxine-pyriméthamine.

Comprimés de 50mg d'artésunate + 500mg de sulfadoxine + 25mg de pyriméthamine

Enfant de 5 à 50kg : ½ à 2 cpm/jour pendant 3 jours d'artésunate + ½ à 2 cpm en 1 prise le premier jour de sulfadoxine-pyriméthamine, en fonction du poids du patient.

Adulte :4 cpm/jour pendant 3 jours d'artésunate +3 cpm en 1 prise le premier jour de sulfadoxine-pyriméthamine

Il n'est pas recommandé d'administrer des dérivés de l'artémisinine en monothérapie par voie orale afin de limiter l'apparition de résistances.

Il est conseillé de donner aux patients une dose de primaquine (0,25 mg/kg) combiné à une CTA afin de diminuer la transmission palustre dans les zones de faible endémicité. Ce médicament agit sur le stade gamétoctaire et permet donc de limiter le nombre de moustiques infectés au cours de leur repas sanguin. La primaquine n'est pas recommandée pour les enfants de moins de 6 mois, pour la femme enceinte ou allaitante.

2.1.2/ Chez la femme enceinte

Les antipaludiques tels que la quinine, la chloroquine, l'atovaquone/proguanil et la clindamycine sont des médicaments sûrs et efficaces pour la femme enceinte. En revanche la doxycycline est contre-indiquée en raison des effets délétères sur l'ossification du fœtus.

Durant le 1^{er} trimestre de grossesse il est recommandé en première intention d'utiliser la quinine associée à la clindamycine (10 mg/kg) deux fois par jour pendant 7 jours, et en seconde intention une CTA ou l'artésunate + clindamycine par voie orale.

2.2) Traitements des formes graves

2.2.1/ Chez l'adulte et l'enfant (figure 8)

* *En 1^{ère} intention : l'artésunate* : 2,4 mg/kg (et 3 mg/kg pour les enfants <20 kg) à H0-H12-H24. L'artésunate est préparé à partir de poudre d'acide artésurique dissoute dans 1 ml de solution de bicarbonate de sodium à 5%, qui sera ensuite dilué dans 5 ml de dextrose à 5%. La perfusion s'effectue immédiatement après la préparation, soit en bolus IV ou en IM. Poursuivre ensuite le traitement une fois par jour et basculer dès que possible vers un traitement *per os*.

* *En 2^{ème} intention : l'artéméter* : 3,2 mg/kg par voie IV, dès l'admission du patient (H0) puis 1,6 mg/kg/jour.

* *En 3^{ème} intention : le dichlorhydrate de quinine* : 20 mg de sel de quinine/kg perfusé à H0 puis 10 mg/kg toutes les 8h (début à H4). Chaque dose de quinine est diluée dans 10 ml/kg de soluté salin isotonique. La vitesse de perfusion ne doit pas dépasser 5 mg de sel de quinine/kg/heure (soit une durée de perfusion allant de 2 à 4 heures) et ne doit jamais être injectée en bolus IV.

Si la perfusion IV n'est pas possible, le traitement se fera par injection IM au niveau de la cuisse (même posologie que la voie IV). Chaque dose de quinine sera alors diluée dans un soluté salin normal à une concentration de 60-100 mg/ml. Afin d'éviter l'administration locale d'un trop grand volume, l'injection s'effectuera sur deux sites différents.

NB : Chez la femme enceinte la quinine provoque régulièrement une hypoglycémie (effet secondaire le plus grave et le plus fréquent) mais sans conséquence pour le fœtus.

2.2.2/ Relais per os :

Les traitements par voie injectable doivent être administrés durant au moins 24h, même si un relais *per os* est possible. Les traitements relais *per os* correspondent à l'administration d'une des 5 CTA citées précédemment.

NB : Ne pas administrer de l'artésunate-méfloquine à un patient atteint du neuropaludisme en raison des risques de réactions neuropsychiatriques.

Dans les zones de faible endémicité, il est également conseillé de donner de la primaquine (0,25 mg/kg) afin de limiter les risques de transmission.

2.2.3/ Traitements de pré-transfert :

Traitement administré au patient si le temps entre la décision de traiter et le traitement définitif est supérieur à 6h :

- Artésunate (1^{ère} intention) : 2,4 mg/kg par voie IM ou 10 mg/kg par voie rectale chez les enfants <6 ans)
- Artéméther (2^{ème} intention) : 3,2 mg/kg par voie IM
- Sel de quinine (3^{ème} intention) : 20 mg/kg par voie IM (dose répartie dans chaque cuisse)

Si le transfert du patient vers un centre de santé disposé à poursuivre le traitement n'est pas possible, poursuivre le traitement de pré-transfert jusqu'à ce que le patient soit capable de prendre un traitement relais *per os* .

2.2.4/ Chez la femme enceinte

Les antipaludiques seront administrés quel que soit le stade de la grossesse et le plus rapidement possible sans diminution des doses : artésunate IV (en 1^{ère} intention), artéméther IM (en 2^{ème} intention), quinine par voie parentérale (mais associée à un fort risque d'hypoglycémie, en 3^{ème} intention)

3. Traitements des autres espèces de *Plasmodium*

3.1) Traitement des formes simples

Si l'espèce plasmodiale n'est pas connue, traiter le patient comme si c'était une infection à *P. falciparum*. En cas d'infection à *P. vivax*, *ovale*, *malariae* et *knowlesi*, traiter les adultes et les enfants avec une CTA ou de la chloroquine.

Afin de prévenir les rechutes dues à *P. vivax* et *ovale*, administrer aux adultes et enfants 0,25-0,5 mg/kg/jour de primaquine pendant 2 semaines (non recommandé pour les femmes enceintes, les enfants < 6 mois, et les personnes présentant une déficience en G6PD). Ce médicament permet d'éliminer les hypnozoïtes hépatiques et donc d'éviter les récurrences de paludisme.

3.2) Traitement des formes graves

Pour le traitement des formes graves à *P. vivax* et *P. knowlesi*, se reporter au traitement relatif à *P. falciparum*. Une administration de primaquine est également conseillée pour limiter les potentielles rechutes.

NB : Un paludisme grave associé à *P. malariae* au retour d'Asie du Sud-Est est très probablement dû à *P. knowlesi*.

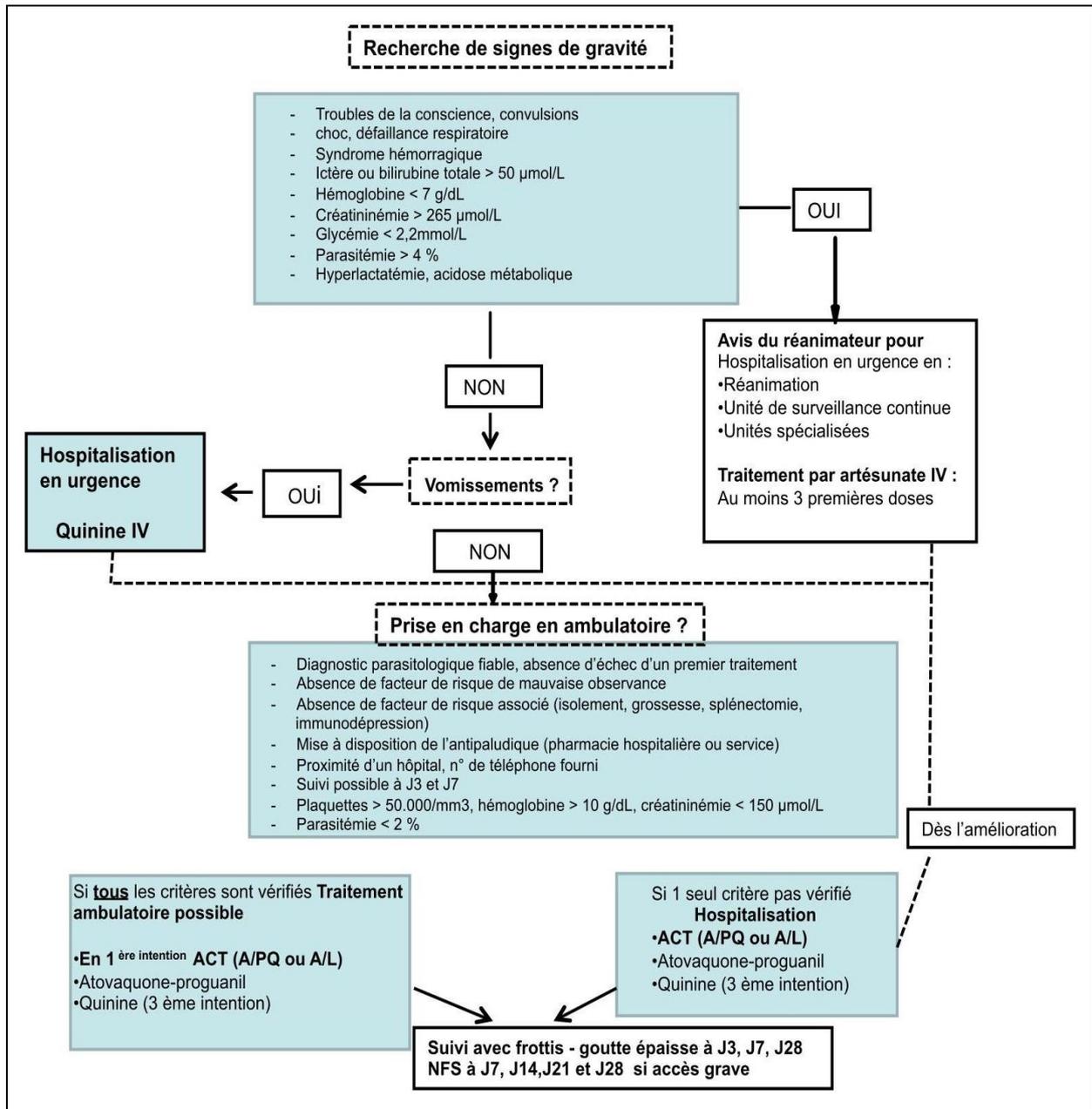


Figure 8 : Algorithme de prise en charge face à un paludisme en France (Spilf)

VIII – PREVENTION ET LUTTE

1. Les moyens actuellement disponibles

1.1) Protection contre les piqûres de moustiques

1.1.1/ Moyens mécaniques

* Porter des vêtements longs, légers, imprégnés de répulsifs

* Appliquer des répulsifs cutanés notamment sur les parties découvertes du corps (bras, chevilles, pieds, ...). L'effet des répulsifs et l'indice de protection sont diminués avec la transpiration, la crème solaire et après une douche. De plus, il est conseillé aux femmes enceintes de ne pas dépasser 3 applications par jour.

* Utilisation de Moustiquaires Imprégnées d'Insecticides (MII) ou Moustiquaires à Imprégnation Durable (MID) : c'est l'outil de prévention principal et le plus efficace en Afrique (imprégnation de pyréthrinoïdes selon les recommandations de l'OMS) (49). Leur durée d'utilisation est de 2 à 3 ans pour une efficacité optimale. En 2015, l'OMS a estimé qu'environ 53% des personnes à risque utilisaient correctement une MID. Cependant, un des problèmes majeurs des dernières années est l'apparition d'une résistance aux insecticides et notamment aux pyréthrinoïdes dans les régions endémiques.

1.1.2/ Lutte collective antivectorielle

* Assainissement des pays impaludés et contrôle des gîtes à moustiques : l'intérêt est de limiter du mieux possible les eaux stagnantes favorables au développement des anophèles. La gestion des gîtes larvaires vise à réduire au maximum les sites de développement des larves d'anophèles (drainage des eaux, utilisation de larvicides ou de prédateurs, élimination des eaux stagnantes)

* Pulvérisation intra-domiciliaire d'insecticides (perméthrine) à effet rémanent à l'intérieur des habitations : pulvérisation efficace 3 à 6 mois en fonction de la formulation de l'insecticide et de la surface pulvérisée. Pour une protection efficace il faut que la pulvérisation couvre environ 80% des habitations d'une zone. En 2015, l'OMS estime que la pulvérisation intra-domiciliaire a protégé 106 millions de personnes. Cependant, au cours de ces dernières années, sont apparues des résistances aux insecticides réduisant ainsi l'effet protecteur des pulvérisations. Il est donc

recommandé de varier les classes d'insecticides utilisées afin de limiter l'émergence de ces résistances.

* Libération de mâles stériles, génétiquement modifiés, afin de limiter la prolifération d'anophèles dans les pays endémiques (après reproduction, les femelles pondent des œufs non fécondés).

1.2) Chimio prophylaxie

Un traitement préventif, ou chimio prophylaxie, permet aux personnes séjournant en zone d'endémicité palustre de se protéger partiellement contre le paludisme. En effet, l'objectif du traitement prophylactique est de garder une concentration d'antipaludique dans le sang. Il ne garantit pas une protection absolue mais permet de diminuer les risques de développer un paludisme grave. De plus, toute fièvre au retour d'un séjour en zone d'endémie doit être considérée comme un paludisme jusqu'à preuve du contraire.

Le choix de la molécule tient compte du lieu de séjour (risque palustre, intensité de transmission, résistance, voyage itinérant ou non), de la durée et la période du séjour, et des caractéristiques du sujet (âge, poids, grossesse, antécédents, allergie, contre-indication, ...). Afin d'appliquer une chimio prophylaxie adaptée à chaque zone géographique, il a été défini quatre groupes, différenciés par la présence ou l'absence, ainsi que le degré de chloroquino-résistance :

- Groupe 0 : pas de paludisme => pas de chimio prophylaxie
- Groupe 1 : pas de chloroquino-résistance
- Groupe 2 : présence de chloroquino-résistance
- Groupe 3 : prévalence élevée de chloroquino-résistance ou de multirésistance

Les molécules actuellement recommandées ainsi que les modalités de prises sont résumées dans le Tableau 4 (50,51). Tout traitement prophylactique doit être prescrit par un médecin et doit être pris de préférence au cours d'un repas. Le traitement préventif doit être poursuivi après le retour d'une zone d'endémicité palustre, cette durée est dépendante de la molécule prescrite. En cas de séjour inférieur à une semaine, une chimio prophylaxie n'est pas forcément obligatoire. En cas de séjour supérieur à 3 mois, un traitement préventif est généralement donné afin de couvrir les 6 premiers mois.

Tableau 4 : Médicaments utilisés en chimioprophylaxie du paludisme chez l'adulte et l'enfant, InVS (BEH), 2015

Molécule	Présentations	Posologies enfant et adulte	Durée, indications, précautions d'emploi, contre-indications
Atovaquone-Proguanil	Cp* pédiatrique (cpP) à 62,5 mg/25 mg Cp adulte (cpA) à 250 mg/100 mg	<u>Enfant</u> : 5-<7 kg : ½ cpP/j (hors AMM) 7-<11 kg : ¾ cpP/j (hors AMM) 11-<21 kg : 1 cpP/j 21-<31 kg : 2 cpP/j 31-≤40 kg : 3 cpP/j >40 kg : 1cpA/j <u>Adulte</u> : 1 cpA/j	À prendre au cours d'un repas ou avec une boisson lactée. Début du traitement : 24 ou 48 h avant le jour d'arrivée. À prendre pendant le séjour et 1 semaine après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme. Prescription limitée à 3 mois Peut-être envisagé, si nécessaire, chez la femme enceinte.
Chloroquine	Sirap à 25 mg= 5ml Cp sécable à 100mg	<u>Enfant</u> : 1,5 mg/kg/j <8,5 kg : 12,5 mg/j ≥8,5-16 kg : 25 mg/j ≥16-33 kg : 50 mg/j ≥33-45 kg : 75 mg/j >45 kg : 1 cp/j <u>Adulte</u> : 1 cp/j	À prendre pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme. Peut être administré à la femme enceinte. Attention aux intoxications accidentelles.
Chloroquine-Proguanil	Cp à 100 mg/200 mg	<u>Enfant</u> : à partir de 15 ans et >50 kg : 1 cp/j <u>Adulte</u> : 1 cp/j	À prendre en fin de repas, au moins 24 h avant le départ, pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme. Réservé aux adultes et adolescents de 15 ans et plus et pesant au moins 50 kg. Peut être administré à la femme enceinte.
Doxycycline	Cp à 50 mg Cp à 100 mg Cp sécable à 100 mg	<u>Enfant</u> : ≥8 ans et < 40 kg : 50 mg/j ≥ 8 ans et ≥ 40 kg : 100 mg/j <u>Adulte</u> : 100 mg/j	À prendre pendant le repas du soir au moins 1 heure avant le coucher, la veille du départ, pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme. Contre-indications : femme enceinte, enfant âgé de moins de 8 ans. Effets indésirables : notamment photosensibilisation.
Méfloquine	Cp sécable à 250 mg	<u>Enfant</u> : 5 mg/kg/semaine 15-19 kg : ¼ cp/sem >19-30 kg : ½ cp/sem >30-45 kg : ¾ cp/sem >45 kg : 1 cp/sem <u>Adulte</u> : 1 cp/sem	À commencer 10 jours avant le départ jusqu'à 3 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme. Contre-indications : convulsions, troubles neuro-psychiques. Déconseillé en cas de pratique de la plongée. Peut-être administré à la femme enceinte.
Proguanil	Cp sécable à 100 mg	<u>Enfant âgé de 1 à 12 ans</u> : 3 mg/kg/j 9-16,5 kg : ½ cp/jr 17-33 kg : 1cp/jr 33,5-45 kg : 1cp ½ /jr <u>Adulte et enfant âgé de plus de 12 ans</u> : 200 mg/j	Uniquement en association avec la chloroquine. À prendre pendant le séjour et 4 semaines après avoir quitté la zone de risque de transmission du paludisme. Peut être administré à la femme enceinte.

*Cp : comprimé. Avant l'âge de 6 ans pour des raisons pratiques, il peut être nécessaire d'écraser les comprimés.

1.3) Traitements préventifs

Ces stratégies, recommandées par l'OMS en Afrique sub-saharienne, sont sûres et possèdent un bon rapport coût/efficacité.

* *Traitement préventif intermittent pendant la grossesse (TPIg)* : Administration de sulfadoxine-pyriméthamine (3 doses minimum, espacées d'au moins un mois) à toutes les femmes enceintes vivant en zone d'endémicité moyenne à forte, lors des consultations

prénatales après le 1^{er} trimestre de grossesse. Cependant en 2015, seules 31% des femmes enceintes ont bénéficié de ce traitement (Figure 9).

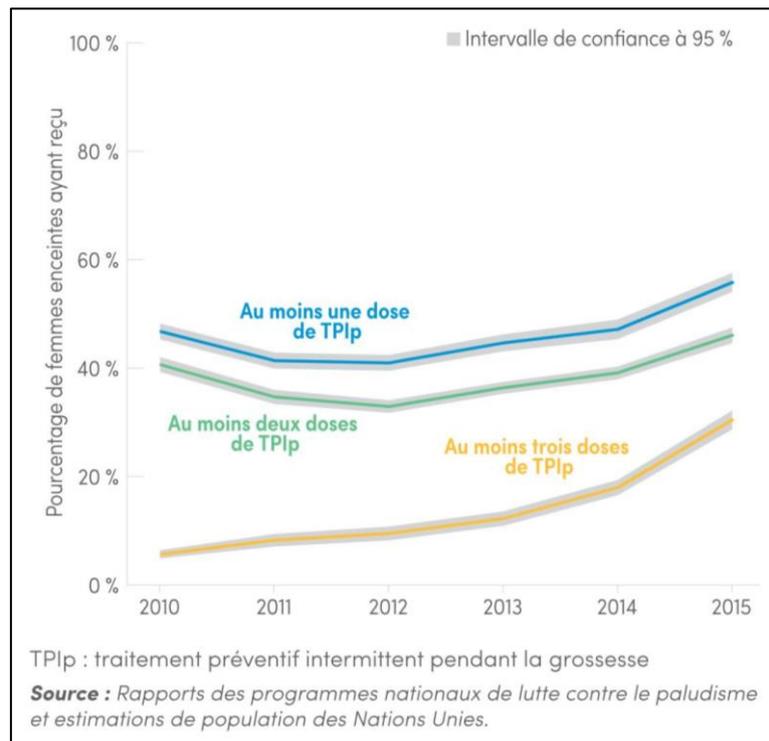


Figure 9 : Pourcentage de femmes enceintes ayant reçu un TPIg, par nombre de doses en Afrique subsaharienne entre 2010 et 2015. (Rapport sur le paludisme dans le monde, OMS, 2016)

* *Traitement préventif intermittent du nourrisson (TPIIn) :* Pour les enfants de moins d'un an vivant dans des zones de forte endémicité palustre, donner de la sulfadoxine-pyriméthamine (3 administrations durant la première année de vie : 10 et 14 semaines puis à 9 mois) en même temps que les vaccins systématiques (DTP, rougeole). Cependant en 2016 seule la Sierra Leone a mis en place ce type de traitement préventif (9).

* *Chimioprévention du paludisme saisonnier (CPS) pour les enfants de moins de 5 ans :* Administration d'amodiaquine et de sulfadoxine-pyriméthamine (traitement d'un mois), durant toute la saison des pluies (en général 3-4 mois environ) chez les enfants de moins de 5 ans vivant en Afrique sub-saharienne dans une zone de forte endémicité palustre. Si le CPS est mis en place, le TPIIn ne doit pas être utilisé. Ce traitement préventif, recommandé par l'OMS en 2012, permettrait de diminuer de 75% le nombre de paludismes graves (9). En 2015 seuls 10 pays utilisaient ce traitement (Burkina Faso, Gambie, Guinée, Guinée-Bissau, Mali, Niger, Nigéria, Sénégal, Tchad, Togo) (9,52).

1.4) La recherche vaccinale

L'immense majorité des recherches vaccinales actuellement en cours s'intéressent à *P. falciparum*, d'une part car c'est l'espèce plasmodiale la plus dangereuse pour l'homme, mais également parce que *P. vivax*, *ovale* et *malariae* sont non cultivables *in vitro*. Des dizaines de candidats vaccins sont actuellement testés (essais cliniques de phase I, II ou III). Certains vaccins ciblent le stade pré-érythrocytaire ou hépatique (RTS,S/AS01, ChAd63/MVA ME-TRAP, PfSPZ), d'autres la phase sanguine (GMZ2, P27A, MSP3), d'autres le cycle sexué... Pour l'instant un seul candidat vaccin, le RTS,S/AS01 (ou Mosquirix®) a réussi à terminer les essais de phase III et démarre des tests à grande échelle dans le cadre d'études pilotes de l'OMS.

Ce vaccin est composé de deux antigènes : la protéine de surface du sporozoïte de *P. falciparum* ou circumsporozoïte (CSP) et la protéine HBs, formant alors des particules non infectieuses appelées VLP (Virus-Like-Particle). Ces dernières sont produites dans des levures de *Saccharomyces cerevisiae* par la technique de l'ADN recombinant permettant d'obtenir des protéines recombinantes purifiées (53). L'adjuvant AS01 est également ajouté afin d'améliorer l'efficacité du vaccin. Il est composé de liposomes, MLP (lipide A monophosphorylé (composant bactérien non toxique) et de QS21 (une saponine).

L'histoire du Mosquirix® débute dans les années 1990, au laboratoire GlaxoSmithKine (GSK). Le docteur Joe Cohen eut l'idée d'associer des extraits de CSP de *P. falciparum* à un antigène de surface du virus de l'hépatite B créant alors le vaccin RTS,S. Comme tous les vaccins, ce dernier a pour but de stimuler le système immunitaire de l'organisme en produisant des anticorps protégeant alors le patient en cas d'infections ultérieures.

A la fin des années 1990, les études cliniques de phase I réalisées aux Etats-Unis sur des adultes volontaires sains, révèlent que le RTS,S n'est pas dangereux pour l'homme et que 6 patients sur 7 ont été immunisés. Dans les années 2000, les premiers tests de phase II sont réalisés sur des enfants et adolescents vivant dans des zones endémiques du paludisme en Afrique. Les essais de phase III ont quant à eux débuté en 2014 et ont été réalisés sur environ 15 000 enfants dans 7 pays d'Afrique sub-saharienne (Burkina Faso, Gabon, Ghana, Kenya, Malawi, Mozambique et Tanzanie). Deux tranches d'âge ont été ciblées : les nourrissons (administration du vaccin à 6 ; 10 et 14 semaines, en même temps que les autres vaccins systématiquement administrés) et les jeunes enfants (administration de la première dose du vaccin entre 5 et 17 mois). Le vaccin n'a présenté aucun effet indésirable grave, mais des convulsions fébriles ont parfois été décrites dans les jours suivants l'injection du vaccin, sans conséquence sur la santé

des patients. Les résultats de ces essais indiquent que le vaccin ne confère qu'une protection partielle face au paludisme chez le jeune enfant (environ 56% des 5-17 mois et 31% des 6-12 semaines ont été protégés lors de leur première infection palustre). De plus, l'efficacité de cette protection diminue considérablement au bout d'un an.

Malgré cela, en juillet 2015, l'Agence Européenne du Médicament (EMA) donne un avis scientifique favorable au Mosquirix® afin qu'il soit utilisé chez les enfants de 6 semaines à 17 mois vivant en zone d'endémie palustre pour les protéger contre le paludisme (et contre l'hépatite B) (54). Cependant, du fait de sa protection modeste, l'EMA insiste sur le fait que ce vaccin n'a pas pour but de remplacer les traitements actuellement efficaces contre le paludisme mais se positionne plus comme un outil complémentaire aux différentes mesures préventives, diagnostiques et de traitements. En octobre 2015, 2 groupes consultatifs indépendants de l'OMS recommandent la mise en œuvre de projets pilotes dans 3 pays d'Afrique sub-saharienne (55). En novembre 2016, l'OMS accepte les recommandations des groupes consultatifs et planifie le début des vaccinations en 2018 dans 3 pays d'Afrique, dans le cadre de projets pilotes de l'OMS (56). Ces projets viseront à évaluer la faisabilité de l'administration en intra-musculaire des 4 doses requises du vaccin, son innocuité et son impact en termes de santé publique. Le Mosquirix® est donc à ce jour le seul vaccin antipaludique au monde à avoir terminé les essais de phase 3.

2. Bilan et objectifs de l'OMS

La prévention sauve des vies, et de plus en plus de personnes à risque ont accès à des outils de prévention efficaces. Entre 2011 et 2015, l'OMS estime que plus de 663 millions de cas ont été évités en Afrique sub-saharienne suite à une prévention efficace, dont environ 70% évités grâce à l'utilisation de MID (9). Une bonne utilisation des MID, la pulvérisation d'insecticides, et le traitement préventif pour les personnes à risque permettraient de réduire de plus de 50% la mortalité due au paludisme. Selon le *Rapport sur le paludisme dans le monde de 2016* de l'OMS, à l'échelle mondiale entre 2010 et 2015, le nombre de cas de paludisme a baissé de 21% et le nombre de décès de 29% (9). Des efforts restent donc à fournir. En effet, le paludisme est une maladie que l'on peut prévenir et traiter. « Tout décès imputable au paludisme, maladie qu'il est possible d'éviter ou de traiter, est simplement inacceptable », Dr P. Alonso, Directeur du Programme mondial de lutte antipaludique à l'OMS.

De plus, le nombre de personnes ayant accès à des outils de prévention reste encore trop faible. L’OMS estime que 43% des personnes à risque ne disposent ni de MID ni de pulvérisation insecticide, et que 69% des femmes enceintes n’ont pas accès à un traitement préventif efficace (Figure 10) (9).

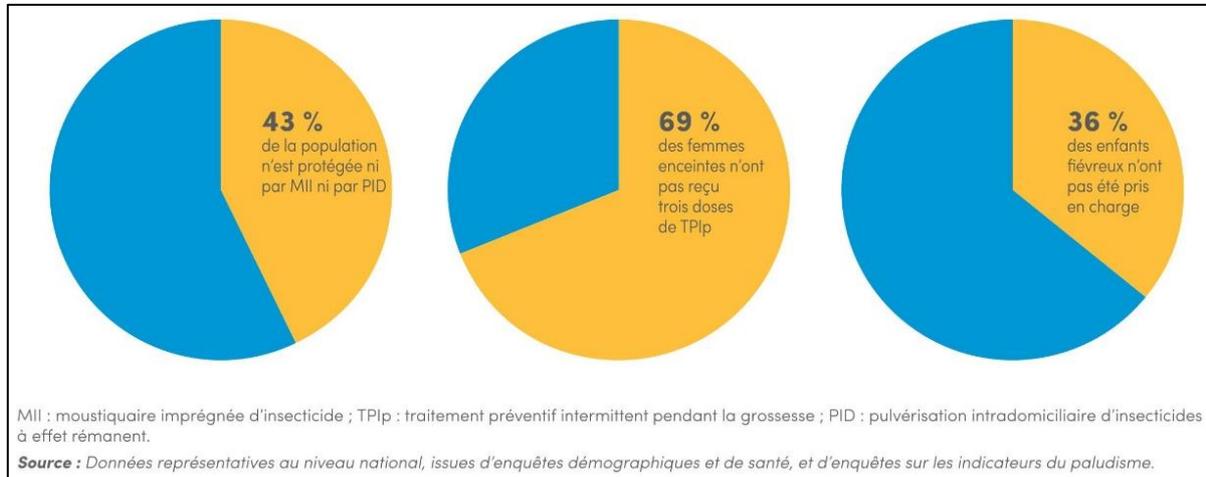


Figure 10 : Pourcentage de la population non couverte par MID ou PID, pourcentage de femmes enceintes n’ayant pas reçu trois doses de TPIp et pourcentage d’enfants fiévreux non pris en charge en Afrique sub-saharienne (Rapport sur le paludisme dans le monde, OMS, 2016)

En 2015, l’OMS a proposé « La stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030 ». Cette dernière vise à lutter plus efficacement contre le paludisme en ayant pour objectifs de réduire l’incidence et la mortalité de 40% entre 2015 et 2020, et de 90% en 2030 (1). Elle vise également l’élimination de la maladie dans au moins 35 des 91 pays où la transmission du paludisme sévit toujours. L’élimination du paludisme dans un pays implique qu’aucun cas autochtone n’ait été décrit dans le pays durant au moins 3 ans pour les 4 espèces de *Plasmodium* infectant l’homme. Depuis 2015, la région européenne a stoppé la transmission autochtone de paludisme (25), et plusieurs pays ont récemment éliminé le paludisme : les Emirats arabes unis (2007), le Maroc (2010), le Turkménistan (2010), l’Arménie (2011), les Maldives (2015), le Sri Lanka (2016) et le Kirghizistan (2016) (9).

Cependant, l’investissement dans la lutte contre le paludisme reste trop faible pour atteindre les objectifs fixés par l’OMS. En 2015, les fonds de lutte contre le paludisme étaient de 2.9 milliards de dollars alors que l’OMS en espérait deux fois plus pour répondre aux objectifs à l’horizon 2030. Les pays les plus endémiques pour le paludisme ne disposent toujours pas de moyens financiers et matériels suffisants pour assurer une surveillance efficace. Celle-ci implique d’évaluer la répartition de la maladie (incidence, prévalence, distribution géographique et sociale), l’apparition de résistances potentielles, l’efficacité des moyens de lutte (lutte antivectorielle, antipaludiques, ...).

IX – RESISTANCE PARASITAIRE

Les premières résistances aux insecticides et aux molécules antipaludiques sont apparues dans les années 1960 en Asie et en Amérique du Sud, avec une résistance progressive à la chloroquine, qui s'est répandue en Afrique environ 20 ans plus tard. La résistance à la méfloquine est quant à elle apparue dans les années 1990 en Asie du Sud-Est, 5 ans seulement après le début de son utilisation. Une trop forte pression médicamenteuse a conduit à la sélection de mutations permettant aux parasites de résister aux traitements (57).

La résistance de *P. falciparum* à la chloroquine est due à la mutation d'un gène situé sur le chromosome 7 et codant pour la protéine Pfcr1 (*P. falciparum* chloroquine resistance transporter) (58). De plus, la mutation du gène codant pour la dihydrofolate réductase, enzyme cible des antipaludiques tels que le proguanil et la pyriméthamine, rend ces médicaments inefficaces. De même pour la mutation du gène codant pour la dihydroptéroate synthase, cible d'un autre antipaludique, la sulfadoxine qui devient elle aussi inefficace (59). La résistance du parasite à l'amodiaquine est quant à elle due à une mutation du gène codant pour la P-glycoprotéine homologue (Pgh1), protéine agissant comme une pompe à efflux ne permettant donc pas à l'antipaludique d'atteindre sa cible.

Afin de lutter contre ces résistances, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont ainsi été mises en œuvre comme le développement d'associations médicamenteuses et, dans les années 1990, la mise sur le marché des médicaments à base d'artémisinine. Malheureusement, l'efficacité de ces nouvelles molécules a progressivement diminué, notamment en Asie, entraînant une augmentation de la clairance parasitaire (60,61). Ces résistances sont dues à une mutation du génome de *P. falciparum* au niveau du locus « K13 » (62). Actuellement 5 pays d'Asie du Sud-Est sont touchés par ces phénomènes de résistance : la Thaïlande, le Cambodge, le Laos, le Viet-Nam et la Birmanie. Afin de limiter le risque de propagation, les médicaments à base d'artémisinine (artémether, artesunate, dihydroartémisinine) sont associés à un autre antipaludique localement efficace pour former les CTA (combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine), ce qui permet de limiter les risques de résistance.

La résistance aux antipaludiques a de nombreuses conséquences : elle induit une augmentation de la prévalence de la maladie et de la gravité des signes cliniques, une diminution du temps

entre deux crises palustres, une augmentation du nombre de traitements administrés chaque année mais également de plus en plus d'échecs thérapeutiques. Les zones de résistance s'étendent, le nombre de souches résistantes augmentent ainsi que le niveau de résistance. Il est également maintenant possible d'observer des poly-résistances dans une même zone endémique. Lutter contre ce phénomène constitue donc un défi majeur de ces prochaines années, d'autant plus qu'aucun vaccin n'est actuellement disponible et que l'industrie pharmaceutique peine à trouver de nouvelles molécules efficaces contre le paludisme.

2^{ème} PARTIE :

**ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE
CELLULAIRE DANS LE NEUROPALUDISME
CHEZ DES ENFANTS BENINOIS**

INTRODUCTION

1. Physiopathologie et rôle de la réponse immunitaire dans le neuropaludisme

La physiopathologie du neuropaludisme est encore mal connue, cependant il est admis que les GRi sont séquestrés dans les vaisseaux sanguins cérébraux (63) et cytoadhèrent à l'endothélium cérébral via des ligands parasitaires (PfEMP1 en particulier) et récepteurs endothéliaux (CD36, ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, E-selectine, ...). L'interaction GRi/endothelium ainsi que la production de toxines et ligands inflammatoires via les GRi conduit à l'activation des cellules endothéliales. Ces dernières vont alors sécréter des cytokines et chémokines (TNF γ , IFN γ , Interleukines, MCP-1, ...) conduisant au recrutement de plaquettes et cellules immunitaires (monocytes/macrophages, lymphocytes, ...). Un processus inflammatoire local se met alors en place (64,65), accompagné d'un mécanisme de rétrocontrôle positif qui conduit à une production croissante de facteurs de l'inflammation et notamment du TNF α (cytokine pro-inflammatoire induisant une augmentation des molécules d'adhésion amplifiant le phénomène de séquestration), et un recrutement accru de cellules de l'immunité. Ces dernières vont à leur tour produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) telles que O $_2^*$, NO * , ou H $_2$ O $_2$, créant alors un stress oxydant favorisant l'élimination des GRi mais produisant parallèlement des dommages cérébraux. De plus, les astrocytes et les cellules microgliales situées dans le cerveau vont produire, sous l'effet de cytokines et des ROS d'autres cytokines et chémokines amplifiant encore le processus de neuroinflammation. Le processus inflammatoire accompagné d'un environnement oxydant participe à l'élimination d'une partie des GRi par phagocytose des monocytes/macrophages et par sécrétion directe des toxines et ROS. Ainsi le microenvironnement est chargé de particules et Ag parasitaires.

Les antigènes parasitaires peuvent être captés par endocytose par les cellules endothéliales qui vont jouer le rôle de cellules présentatrices d'antigènes pour les LT. Il a récemment été montré que les LT CD8 jouent alors un rôle délétère en induisant l'apoptose de ces cellules endothéliales présentant des Ag parasitaires (66,67). Pour éliminer ces cellules identifiées comme du non-soi, les LT CD8 vont sécréter perforines et granzymes, protéines qui vont lyser les membranes cellulaires. Les cellules endothéliales constituant la base de la barrière hémato-

encéphalique (BHE), celle-ci est fragilisée suite à ces événements. L'ensemble de ce processus conduit à une obstruction du flux sanguin cérébral, une augmentation de la pression intracrânienne, une hypoxie et l'altération de la BHE (Figure 11).

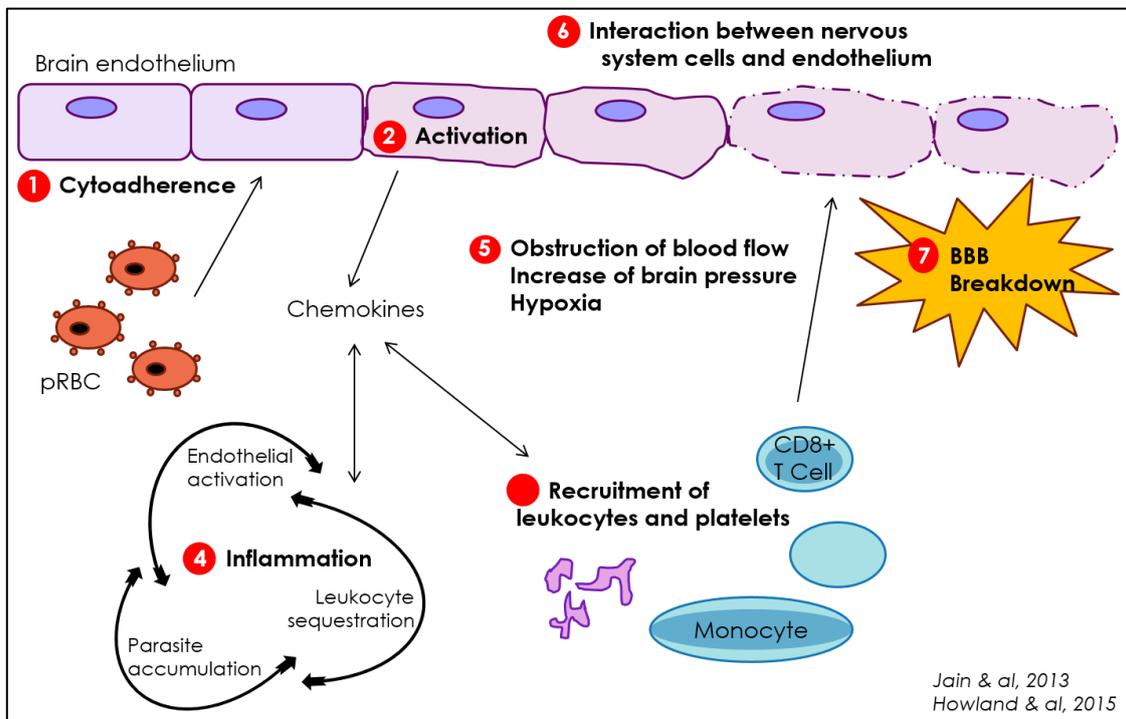


Figure 11 : Mécanismes physiopathologiques du neuropaludisme

L'équilibre redox est un problème majeur mais mal compris dans la physiopathologie du neuropaludisme. La production de ROS à la fois par le parasite (digestion de l'hémoglobine) et des cellules inflammatoires, provoque des dommages importants sur les cellules de l'hôte, particulièrement sur les neurones (68–70). Ce processus augmente le stress oxydatif délétère pour l'intégrité de la BHE (68). En effet, les processus pro-oxydants conduisent à un déséquilibre entre les oxydants plasmatiques et le système antioxydant de l'hôte, entraînant alors un stress oxydatif. Cependant, la production de ROS par les monocytes/macrophages est un mécanisme de défense efficace de l'hôte, processus également mis en place dans plusieurs thérapeutiques, y compris les dérivés de l'artémisinine (71). Une équipe a démontré que l'administration d'hème, molécule hautement pro-oxydante, permettait de protéger des souris atteintes de neuropaludisme (72). Pour contrebalancer l'excès de molécules oxydantes, des molécules antioxydantes enzymatiques (SOD, NQO-1, HO-1) et non enzymatiques (glutathion réduit, vitamines A, E, C) sont produites. Ainsi, il semblerait que la réponse oxydative constitue une étape nécessaire à la résolution de la neuroinflammation. L'issue favorable de la pathologie

repose probablement sur un basculement vers une réponse anti-inflammatoire et résolutive après une étape oxydative.

Le rôle du stress oxydatif ainsi que celui des macrophages infiltrés et de la microglie est très peu décrit dans le contexte du neuropaludisme. Ces derniers jouent un rôle crucial dans l'induction et la résolution de la neuroinflammation notamment grâce à leur capacité de polarisation. En fonction des signaux perçus dans leur environnement, les macrophages peuvent basculer d'un phénotype M1 pro-inflammatoire au phénotype M2 résolutif (73). Une étude récente menée dans un contexte non infectieux a mis en évidence qu'un stress oxydatif majeur conduisait à la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 et à la résolution de la neuroinflammation (74). Ce phénotype M2 résolutif des macrophages dépend de plusieurs signaux tels que la reconnaissance des cellules inflammatoires apoptotiques, l'interaction avec les cytokines anti-inflammatoires et les médiateurs lipidiques (75). La récupération fonctionnelle du cerveau semble s'appuyer sur la polarisation M2 de la microglie et des macrophages infiltrés pour réduire la neuroinflammation et le stress oxydatif (68,76–78). De récentes études menées dans notre laboratoire ont mis en évidence le rôle primordial du phénotype des macrophages et des monocytes dans la neuroinflammation et sa résolution au cours d'un paludisme expérimental sur modèle murin et d'un paludisme gestationnel (79,80). Le rôle de la polarisation des macrophages dans le processus physiopathologique du neuropaludisme chez l'homme reste donc à élucider.

2. Stratégies immunothérapeutiques

Le traitement du paludisme repose sur 2 aspects : l'élimination du parasite via un antipaludique efficace (artésunate) et la résolution de l'inflammation cérébrale. Divers traitements adjuvants sont utilisés pour diminuer cette neuroinflammation et plusieurs approches ont été testées mais ne sont pas utilisées en routine.

2.1) Les molécules utilisées couramment

** Le paracétamol :*

Recommandé par l'OMS, le paracétamol est un anti-inflammatoire qui limite la production de prostaglandines et permet de diminuer les crises fébriles (15 mg/kg toutes les 4h, voie orale ou rectale).

* *L'aspirine* :

En agissant comme anti-coagulant, l'Aspirine permet de limiter la formation de thrombus veineux lié à l'accumulation des GRi, GR sains et cellules de l'immunité dans les capillaires cérébraux (81). Cependant, une étude menée sur des patients atteints de paludisme grave montre que l'aspirine, ne provoque aucune amélioration clinique chez ces patients et que la mortalité n'est pas diminuée (82).

* *Le diazepam* :

Recommandé par l'OMS, il permet de limiter les convulsions en agissant au niveau du SNC en modulant l'ouverture du canal chlore.

2.2) Les molécules testées par des protocoles de recherche

Si de nombreuses études se révèlent efficaces sur des modèles animaux, la plupart de ces molécules sont très discutées lors de leur application à l'homme. En voici une liste non exhaustive :

* *Molécules à visée anti-inflammatoire* :

- Dexaméthasone : ce médicament est un glucocorticoïde de synthèse utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Des études ont montré que son utilisation au cours d'un neuropaludisme chez l'homme ne permettait pas la diminution de la mortalité mais augmentait les risques de complications digestives ou respiratoires (83,84).

- Immunoglobines IV : dans le cadre d'un neuropaludisme, la réduction de l'inflammation systémique grâce à l'administration chez l'homme d'Immunoglobulines IV n'a pas permis de diminuer la mortalité, et des séquelles neurologiques ont notamment été décrites dans certaines études (85).

- Anticorps monoclonal TNF α : De nombreuses études ont révélé que l'utilisation d'anticorps anti-TNF α chez l'homme ne permettait pas d'améliorer la survie des patients atteints de neuropaludisme et aggraverait même les complications neurologiques (86).

- Rosiglitazone : ce médicament est initialement un antidiabétique oral, agoniste du récepteur PPAR γ impliqué dans la polarisation M2 des macrophages et la résolution de l'inflammation. Ce récepteur joue un rôle majeur dans le contrôle de la réponse immunitaire et en diminuant l'inflammation générée au cours de la pathologie. Une étude clinique de phase II menée sur des enfants atteints de paludisme simple a évalué la tolérance, la sécurité et l'efficacité de la rosiglitazone. Les résultats ont montré que les patients traités avec de la rosiglitazone n'ont pas développé d'hypoglycémie ni d'autre complication clinique et biologique (87). Une nouvelle

étude est actuellement en cours afin d'évaluer l'efficacité de cette molécule sur des patients atteints de paludisme grave (88). C'est actuellement la molécule la plus prometteuse.

** Molécules visant à réduire le stress oxydant :*

- N-acétyl-cystéine ou NAC : ce médicament possède des propriétés antioxydantes en stimulant la production du glutathion. Il permet donc de lutter contre le stress oxydant observé lors d'un neuropaludisme. Cependant, ce stress oxydant peut s'avérer bénéfique pour le patient car il améliore l'élimination des parasites et limite la cytoadhérence des GRi aux cellules endothéliales. Des études menées chez l'homme ont cependant montré que d'administration de NAC lors d'un neuropaludisme n'avait aucun effet sur l'amélioration clinique ou la mortalité des patients (89,90).

** Molécules visant à augmenter le niveau de NO :*

L-Arginine : Le monoxyde d'azote, ou oxide nitrique (NO), est une molécule endogène synthétisée à partir de L-arginine et d'oxygène. Le NO est libéré par les cellules endothéliales, les macrophages ou encore les neurones et a été identifié comme jouant un rôle dans le processus physiopathologique du neuropaludisme (91). En effet, il aurait la capacité de réduire la cytoadhérence des GRi aux cellules endothéliales, d'induire une vasodilatation, de diminuer l'agrégation plaquettaire, ou encore de jouer un rôle dans les mécanismes d'apoptose cellulaire (92). Des études cliniques sont en cours afin d'évaluer plus précisément la potentielle utilisation du NO en tant que traitement adjuvant du paludisme grave chez l'homme.

** Molécules visant à inhiber la cytoadhérence :*

- Aptamères : De nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des aptamères (oligonucléotides synthétiques capables de fixer un ligand) sont actuellement étudiées afin d'inhiber la cytoadhérence des GRi aux cellules endothéliales et limiter le rosetting (en inhibant par exemple l'adhésion de la protéine PfEMP1 à ses récepteurs) (93).

- Levamisole : ce médicament aurait la propriété d'inhiber l'adhésion des GRi au récepteur CD36 présent à la surface de l'endothélium vasculaire, limitant alors la cytoadhérence et donc la séquestration des GRi dans les capillaires sanguins. Cependant, une étude menée sur des patients atteints de paludisme grave a montré que l'administration de Levamisole ne présentait aucun bénéfice quant à l'évolution de la pathologie (94).

** Molécules visant à limiter les effets néfastes au niveau du cerveau :*

- Erythropoïétine : l'EPO est une hormone stimulant la production de GR au niveau de la moelle osseuse. Elle a des propriétés neuroprotectrice, anti-inflammatoire, anti-oxidante et anti-

apoptotique. Des études ont montré qu'un niveau élevé d'EPO est corrélé à une diminution du déficit neurologique (95,96). Mais une récente étude menée en Inde sur des patients atteints de neuropaludisme a montré des résultats inverses : le niveau d'EPO était positivement corrélé à la gravité palustre (97). Des études sont encore nécessaires afin de mieux évaluer le potentiel rôle bénéfique de cet hormone.

** Molécules agissant sur le Fer :*

- Desferrioxamine ou Deferipone : ces deux médicaments sont des chélateurs de fer, ils permettent donc de diminuer la quantité de Fer présent dans la circulation sanguine nécessaire à la reproduction du parasite et de réduire la production de ROS. S'ils permettent, chez l'homme atteint de paludisme grave, de limiter la parasitémie, ils sont néanmoins responsables de complications graves (anémie sévère, voire parfois augmentation de la mortalité) (98).

** Molécules visant à diminuer la pression intra-cérébrale et l'œdème cérébral :*

- Mannitol : les solutés de mannitol sont hypertoniques (création d'un gradient osmotique entraînant l'eau à sortir des cellules), ils permettraient de diminuer la pression intra-cérébrale. Cependant des études réalisées sur l'homme n'ont pas montré d'amélioration de la survie, le mannitol induirait même une augmentation du délai de coma et aggraverait donc l'évolution de la pathologie (99–101).

OBJECTIFS DU PROJET

Ce projet a été mené au sein du laboratoire PHARMA-DEV (UMR 152, IRD/UPS, Toulouse III), en collaboration avec le laboratoire MERIT (Mère et Enfant face aux infections tropicales, UMR 216, IRD/Université Paris Descartes) à Paris, et le laboratoire CERPAGE (Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance) à Cotonou au Bénin. Il vise à mieux comprendre la physiopathologie du neuropaludisme dans le but *in fine* de proposer de nouvelles stratégies de prise en charge de cette maladie pour une approche immunothérapeutique. En effet, malgré un traitement antipaludique efficace à base d'artémisinine, le taux de létalité du neuropaludisme est estimé à 20% et l'incidence des séquelles neurologiques entre 4 et 14% (3).

Dans un premier temps et pour cette thèse de pharmacie, notre objectif principal était de rechercher un profil cellulaire spécifique du neuropaludisme dans les cellules du sang périphérique traduisant l'état de neuroinflammation. La plupart des études sur le neuropaludisme ont été menées sur modèles murin. Notre étude permettra de confirmer chez le patient les hypothèses proposées et de déterminer quelle réponse cellulaire est associée aux symptômes du neuropaludisme.

Les données socio-cliniques des patients constituent un aspect important de cette étude menée chez des enfants béninois. En effet, des données telles que l'âge du patient, la prise antérieure de médicament ou l'utilisation d'une moustiquaire sont des paramètres qui participent à la gravité de l'accès palustre. La stratégie de cette étude repose sur la comparaison de 3 groupes de patients béninois : 1/ neuropaludisme, 2/ anémie sévère palustre, 3/ accès simple. Ainsi, nos objectifs sont les suivants :

Objectif principal :

L'objectif principal de cette étude est de déterminer un profil cellulaire spécifique du neuropaludisme (et ainsi de pouvoir en dégager des facteurs de risque et de protection).

Objectifs spécifiques :

1/ Le premier objectif spécifique consistera à comparer les 3 groupes de paludisme sur des critères socio-cliniques.

2/ Le second objectif spécifique s'intéressera à étudier l'état d'activation des lymphocytes T CD8 présents dans le sang en fonction de la gravité de l'accès palustre.

3/ Le troisième objectif spécifique consistera à définir la répartition des sous-populations de monocytes présents dans le sang et leur état d'activation en fonction de la gravité de l'accès palustre.

METHODES

1. Aspects éthiques

Avant son démarrage, cette étude a été acceptée par le Comité d’Ethique institutionnel de l’Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) rattaché à l’Université d’Abomey Calavi du Bénin.

2. Site et population d’étude

L’étude a été menée pendant deux saisons de transmission (mai-juillet) en 2014 et 2016 dans le Sud du Bénin, zone d’hyperendémie du paludisme. Les prélèvements ont été réalisés sur deux sites : l’hôpital pédiatrique de Cotonou (Hôpital Mère et Enfant Lagune, HOMEL) pour les paludismes graves (neuropaludisme, anémie sévère palustre) et le centre médical Saint Joseph à Sô-Tchanhoué (Sud du Bénin, à environ 15km de Cotonou) pour les accès simples. L’étude a porté sur des enfants âgés de 6 mois à 6 ans, population particulièrement vulnérable car n’étant plus protégée par les anticorps maternels et n’ayant pas encore développée d’immunité adaptative. Ces derniers ont été séparés en différents groupes en fonction de leur forme clinique de paludisme : 2 groupes en 2014 (neuropaludisme ou CM, accès simple ou UM), 3 groupes en 2016 (CM, anémie sévère palustre ou SMA, UM), selon les critères suivants :

- Neuropaludisme (CM) : infection à *P. falciparum* confirmée et score de Blantyre ≤ 2 . Le score de Blantyre (SB), utilisé chez le jeune enfant, est un score neurologique allant de 0 à 5 et déterminant le stade du coma (Annexe 1).

- Anémie sévère palustre (SMA) : infection à *P. falciparum* confirmée et taux d’hémoglobine (Hb) ≤ 5 g/dL et score de Blantyre ≥ 3

- Accès simple (UM) : infection à *P. falciparum* confirmée combinée à une fièvre ou une histoire récente de fièvre (température axillaire $> 37,5^\circ$) et absence de signe de gravité.

Ces critères ont été définis à partir des définitions OMS du paludisme grave et du paludisme simple (Voir 1^{ère} Partie, V-Physiopathologie et Symptomatologie, 3.2 Accès palustres graves à *P. falciparum*). Les enfants séropositifs pour le VIH ou présentant une méningite confirmée ont été exclus de l’étude.

Déroulement de l'inclusion des patients : un recrutement exhaustif des enfants a été réalisé pour répondre aux contraintes de temps et de terrain. L'inclusion des patients s'est déroulée en collaboration avec l'équipe soignante des services de pédiatrie des deux centres et n'a pas interféré avec le fonctionnement habituel des deux centres de santé (Annexe 2). A l'arrivée, les enfants étaient examinés cliniquement et un test de diagnostic rapide du paludisme (TDR) était réalisé. Après la signature d'un consentement libre et éclairé par les parents, les enfants présentant les critères d'inclusion de l'un des trois groupes étaient inclus dans le projet (Annexe 3a et 3b). Pour les paludismes graves, les taux d'hémoglobine (Hb) n'étant pas connus à l'inclusion ni le score de Blantyre (SB) de manière précise, la répartition dans les groupes a été faite lors de l'analyse des données. Pour chaque patient, un questionnaire a été rempli avec les parents afin de collecter les données sociales et les antécédents médicaux des patients (âge, sexe, hospitalisation antérieure, prise d'antipaludiques récente,...) (Annexe 4). Les patients inclus ont été pris en charge financièrement par le projet (frais d'hospitalisation et de traitement) et traités selon les recommandations nationales du Bénin par les CTA (Combinaisons thérapeutiques à base d'Artémisinine).

3. TDR, gouttes épaisses et frottis sanguins (GE/FS)

Des TDR (SD Inc, One step malaria antigen Pf test) ont été réalisés avant chaque inclusion. Ce TDR consiste à détecter l'antigène HRP2 (protéine riche en histidine 2) spécifique de *P. falciparum* dans le sang des patients par immunochromatographie. Les GE/FS ont été réalisés à partir du tube de sang veineux ramené au laboratoire (voir point 4) et colorées au Giemsa. Les densités parasitaires (DP) ont été calculées en nombre de parasites par microlitre de sang, en considérant une moyenne de 8000 leucocytes/ μ l de sang. Les lames ont été lues par deux microscopistes différents et la moyenne des deux DP a été calculée.

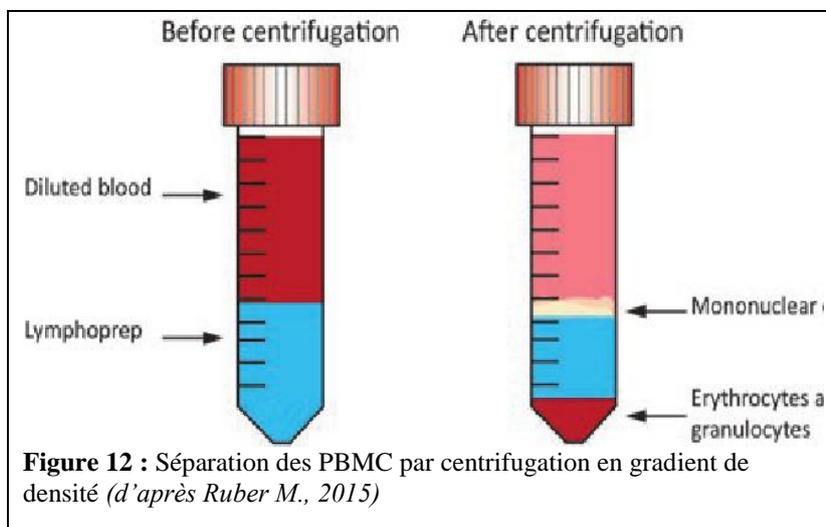
4. Prélèvements sanguins et bilans biologiques

Quatre à huit mL de sang veineux périphérique ont été prélevés en tube EDTA dès l'inclusion (J0) puis 4 mL à J21 afin d'étudier l'évolution de la réponse immunitaire au cours de l'infection palustre. Un bilan biologique à J0 a été réalisé par les personnels de santé des centres médicaux. Ce bilan incluait les mesures classiques présentes dans un hémogramme (Hb, hématocrite, globules rouges, globules blancs, plaquettes, VGM, CCMH et TCMH) ainsi que la glycémie.

La détermination du groupe sanguin de l'enfant ainsi qu'un dosage de l'Hb par Hémocue® ont également été effectués à notre laboratoire. A J0, une ponction lombaire a été effectuée par l'équipe soignante chez les enfants présentant une altération de la conscience afin d'écartier une méningite. Des tests de dépistage rapide du VIH ont également été réalisés en collaboration avec le personnel soignant des deux centres médicaux.

5. Séparation des cellules mononuclées (PBMC)

Les PBMC, cellules mononuclées retrouvées dans la circulation périphérique (correspondant aux lymphocytes et monocytes), ont été séparées du reste de l'échantillon par centrifugation en



gradient de densité Lymphoprep® (Figure 12). L'anneau de PBMC a été récupéré et les cellules lavées en PBS. Les PBMC ont ensuite été congelées en RPMI complété par 30% de sérum de veau fœtal (SVF) et 30% de DMSO une nuit à -80°C avant d'être

placées dans l'azote liquide pour l'étude ultérieure des différentes populations cellulaires présentes. A la fin de l'étude, tous les échantillons de plasmas et de PBMC ont été rapatriés au laboratoire PHARMADEV à Toulouse.

6. Mesure du pourcentage de populations cellulaires et de leur état d'activation par la cytométrie en flux

6.1) Principe de la cytométrie en flux

Cette technique permet de caractériser les cellules présentes dans un échantillon. Les cellules en suspension passent une à une devant les faisceaux lasers et des signaux sont émis par chaque cellule : 1/ la lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des cellules ; 2/ la lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter, SSC) qui renseigne sur la

forme, la structure interne et la granularité des particules ; 3/ les signaux de fluorescence (émise par la cellule elle-même, ou autofluorescence, et émise par un ou plusieurs anticorps couplés à un fluorochrome et qui se lient spécifiquement à la cellule). Les données obtenues permettent de déterminer des pourcentages de cellules définis selon les paramètres choisis ainsi que l'intensité de fluorescence des anticorps testés qui indique le niveau d'expression de l'antigène cible de l'anticorps utilisé. Les signaux lumineux sont transformés en signaux électriques dans les photomultiplicateurs afin de pouvoir être compatibles à une analyse informatique (ici à l'aide du logiciel Java®) comme indiqué en Annexe 5.

6.2) Préparation des échantillons de PBMC et analyse en cytométrie de flux

Les différentes populations cellulaires issues des PBMC (lymphocytes T, lymphocyte B, cellules NK, et monocytes) ont été caractérisées par cytométrie de flux à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes. Pour cela, les PBMC ont été lavées en PBS⁻ (sans calcium et sans magnésium) et reprises dans 1ml de milieux de culture (SFM + 1% de L-Glutamine-Pénicilline-Streptomycine + 10% de SVF). Le nombre de cellules présentes dans chaque échantillon a été déterminé par comptage en cellule de Malassez (lame de verre quadrillée permettant le dénombrement manuel des cellules au microscope) après avoir procédé à une dilution au 1/10^{ème} au bleu trypan, colorant permettant d'apprécier la viabilité des cellules. Selon le nombre de cellules obtenu, 20 000 à 300 000 cellules ont été finalement distribuées pour chaque échantillon en tubes de cytométrie.

Pour chaque échantillon de PBMC, 3 panels ont été réalisés :

- Panel 1 : Analyse de l'ensemble des populations cellulaires immunitaires

Constitué de 7 anticorps (CD3, CD4, CD8, CD25, CD56, CD19, CD14)

- Panel 2 : Analyse de l'activation de lymphocytes T CD8

Constitué de 5 anticorps (CD3, CD8, CD69, CXCR3, CX3CR1)

- Panel 3 : Analyse des sous-populations de monocytes et de leur activation (102)

Constitué de 5 anticorps (CD14, CD16, TLR2, CD36, CCR2) et d'un anticorps marqueur de mortalité cellulaire (Live-Dead)

Les tableaux 5a, 5b, et 5c résument les caractéristiques principales des populations cellulaires et des marqueurs utilisés dans notre analyse.

Tableau 5a. : Description des différentes populations cellulaires présentes dans les PBMC et anticorps spécifiques utilisés pour leurs identifications par cytométrie en flux (Panel 1)

Types de cellules	Actions principales	Anticorps (fluorochrome)
Lymphocyte T (LT)	Responsable de la réponse immunitaire cellulaire spécifique (destruction des cellules pathogènes)	CD3 (VioBlue)
LT CD4	Intermédiaire de la réponse immune (stimule le système immunitaire notamment en produisant l'IL-2), stimule la prolifération et la différenciation des LT CD8 et LB	CD4 (APC Vio770)
LT CD8	Cytotoxique (destruction des cellules infectées)	CD8 (PerCP)
LT régulateur (T reg)	Limite inflammation en inhibant l'activation d'autres cellules immunitaires (LT CD4/8)	CD25 (PE)
Natural Killer (NK)	Lyse les cellules infectées, Stimule les autres cellules de l'immunité (production de cytokines)	CD56 (APC)
Lymphocyte B (LB)	Production d'AC, rôle de cellule mémoire	CD19 (PE VIO770)
Monocyte	Phagocytose, Cellule présentatrice d'Ag, Sécrétion de nombreuses cytokines, Rôle dans la coagulation sanguine	CD14 (PerCP Vio700)

Tableau 5b. : Localisation et fonction des récepteurs ciblés pour l'étude de l'activation des lymphocytes T CD8 et anticorps utilisés en cytométrie en flux (Panel 2)

Récepteur	Localisation	Fonctions	Anticorps (fluorochrome)
CD3	LT	S'associe au récepteur des cellules T (TCR) et permet l'activation des LT	CD3 (VioBlue)
CD8	LT CD8	Agit comme co-récepteur lors d'une interaction avec le CMH-I (activation et amplification du signal)	CD8 (PerCP)
CD69	LT CD8+, LB, NK, Monocytes	Stimule l'activation et la prolifération des LT	CD69 (FITC)
CXCR3	LT CD4 Th1, LT CD8+, T reg, NK, NKT	Stimule la réponse immunitaire de type Th1 (inflammatoire)	CD183 (PE)
CX3CR1	Monocytes résidents, LT CD8+	Récepteur de CX3CL1. Favorise la migration des LT, NK et monocytes anti-inflammatoires	CX3CR1 (PE Vio770)

Tableau 5c. : Localisation et fonction des récepteurs ciblés pour l'étude de l'activation des monocytes et anticorps utilisés en cytométrie en flux (Panel 3)

Récepteur	Localisation	Fonctions	Anticorps (fluorochrome)
CD14	Monocytes	Permet la différenciation des monocytes en cellules dendritiques, Co-Récepteur du LPS	CD14 (PerCP Vio700)
CD16	Monocytes, NK	Intervient dans la cytotoxicité des AC	CD16 (PE)
TLR2	Monocytes, LB, T reg	Active le système immunitaire (monocytes ++), Favorise l'apoptose et le détachement des cellules endothéliales	TLR2 (APC)
CD36	Monocyte, GR, plaquettes	Fixe et phagocyte les GRi par <i>P. falciparum</i> , Stimule la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, Impliqué dans le métabolisme des acides gras	CD36 (FITC)
CCR2	Monocytes et microglie cérébrale, LT CD4, NK	Récepteur de MCP-1. Favorise la migration des monocytes, Oriente vers une réponse immunitaire de type Th1 (inflammatoire)	CCR2 (PE Vio700)
Live-Dead	Toutes les cellules	Permet de différencier les cellules vivantes et mortes	LD (Violet)

Ainsi, pour chaque prélèvement, les PBMC conservées en vue de la cytométrie de flux ont été réparties en trois tubes correspondant aux trois panels. Un dernier tube, appelé « Non Marqué » a été utilisé comme témoin, constitué des PBMC d'un échantillon pris au hasard parmi ceux possédant le plus de cellules, sans anticorps ajouté.

Les PBMC distribuées dans chaque tube de cytométrie ont été centrifugées (5 minutes à 1500rpm) et les tubes du panel 3 ont été marqués au Live-Dead (100µl/tube puis incubation à l'obscurité durant 15 minutes). Les cellules ont ensuite été lavées au PBS^{+/+} puis marquées à l'aide des anticorps de chaque panel (100 µl du mix d'anticorps de chaque panel, 10 minutes à 4°C), et lavées en PBS-1% SVF. Une fois le surnageant éliminé, 300 µl de PBS-1% SVF a été ajouté dans chaque tube avant la lecture au cytomètre. L'ensemble des tubes contenant les PBMC des patients de 2014 et 2016 ont été analysés au cytomètre en flux (Cytometer BD Fortessa®).

6.3) Acquisition informatique des données et stratégie d'analyse de la cytométrie en flux

Sur l'ordinateur d'analyse, des ajustements ont été effectués afin de s'assurer que les spectres d'émission des fluorochromes d'un même panel ne se chevauchaient pas. Les paramètres de taille, de granulosité ou de viabilité ont été collectés ainsi que la répartition de chaque population cellulaire (leurs pourcentages respectifs). Ainsi des fenêtres d'analyse ont été créées pour chaque panel afin de caractériser les cellules et les identifier de façon à limiter les erreurs d'interprétation, à obtenir une analyse la plus homogène possible tout en s'adaptant aux variabilités inter-individuelles (des exemples de stratégie d'analyse de populations sont présentés en Annexe 6). Parallèlement et pour chaque panel, un tableau statistique récapitulatif de l'ensemble des caractéristiques a été créé et a été exporté au format EXCEL. Les paramètres ont alors été triés et le plus pertinent (pourcentages relatifs des populations cellulaires d'intérêt) a été rassemblé pour l'analyse finale. Les échantillons ne possédant pas suffisamment de cellules ont été exclus de l'analyse. Ainsi, dans le panel 1, tous les échantillons ayant moins de 500 cellules CD14+ (monocytes) et moins de 500 cellules CD3+ (lymphocytes) ont été exclus. De même, dans le panel 2, seuls les échantillons ayant plus de 500 cellules CD3+ ont été gardés. Enfin, dans le panel 3, seuls les échantillons possédant plus de 1000 cellules vivantes dont au moins 500 CD14+ ont été inclus dans l'analyse finale.

7. Analyse statistique

7.1) Calcul du nombre de sujets nécessaires et de la puissance de l'étude

Le nombre de sujets nécessaires n'a pas été calculé a priori pour cette étude. Un recrutement exhaustif a été réalisé dans les deux centres de santé associés à ce projet afin de pouvoir maximiser le nombre de sujets inclus dans l'étude. Dans le temps imparti sur le site dont le nombre de cas de paludisme sévères est connu, un minimum de 30 sujets par groupe était attendu (d'après les études précédemment menées dans les mêmes sites). A la vue des variations des niveaux d'expression des marqueurs observés dans les études antérieures, il a été difficile de donner une valeur pertinente de la puissance pour cette étude. Cependant, un calcul a été réalisé sur le logiciel OpenEpi, prenant en compte le pourcentage de LT CD8 obtenus lors d'une étude expérimentale antérieure sur un modèle murin de paludisme, avec 11,3% de LT CD8 dans le groupe neuropaludisme et 1,2% dans le groupe accès palustre simple. La valeur de la puissance ainsi obtenue était de 75%.

7.2) Analyse descriptive des deux bases de données 2014 et 2016

Les données issues des questionnaires patients ainsi que les résultats des examens clinico-biologiques ont été saisis sur le logiciel EXCEL2016 pour l'ensemble des enfants inclus dans cette étude en 2014 et 2016. L'intégralité des variables a été vérifiée pour chaque patient. En cas de doute ou de disparité sur un critère, l'enfant a été retiré de l'analyse finale. Les variables définissant l'appartenance aux trois groupes cliniques (critères d'inclusion) ont été contrôlées et chaque enfant a été réparti dans son groupe clinique définitif. Les enfants ne respectant pas l'ensemble des critères définissant leurs groupes ont été retirés de l'étude. Les résultats des variables quantitatives ont été données en prenant en compte la médiane +/- les 25^{ème} et 75^{ème} percentiles. Les variables qualitatives ont quant à elles été exprimées sous forme de fréquences.

7.3) Analyse descriptive des données de base des échantillonnages de 2014 et 2016

Afin de décider si les résultats des deux échantillonnages réalisés en 2014 et 2016 pouvaient être réunis dans une seule analyse, une première comparaison a porté sur les données de base définissant les critères d'inclusion des sujets (SB, Hb) ainsi que l'âge et la DP, deux facteurs qui ont un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire (103).

7.4) Recherche de critères spécifiques du type d'accès palustre

Dans un premier temps, les données sociales et clinico-biologiques ont été analysées dans le but de dégager des facteurs spécifiques du type d'accès palustre (UM, SMA ou CM). Les paramètres immunologiques (profils cellulaires) ont ensuite été analysés. Les données obtenues à J21 ont été également comparées à celles de J0 en considérant que les J21 reflètent un état contrôle sain. Les données de cytométrie n'ont pas pu être analysées à J21, faute d'un nombre suffisant de prélèvements. Pour ces analyses, le test non paramétrique U de Mann-Whitney a été utilisé pour établir les comparaisons de valeurs continues entre 2 groupes définis par 2 valeurs nominales et le test de Kruskal-Wallis a été utilisé dans le cas de groupes définis par plus de 2 valeurs nominales. Le test du χ^2 (ou test exact de Fisher) a permis de comparer les variables nominales entre les groupes. Le test de corrélation des rangs de Spearman a permis d'établir les corrélations entre deux variables continues. La valeur Rho indique le niveau de corrélation. Les tests statistiques ont été réalisés sur le logiciel StatView et le taux de significativité de ces tests a été fixé à $p < 0.05$.

7.5) Régressions linéaire et logistique

Afin d'identifier les facteurs de risque et de protection du neuropaludisme, une régression linéaire (ou analyse univariée) a été conduite sur l'ensemble des variables socio-cliniques et biologiques. Les résultats sont exprimés en Odds Ratio bruts (OR), avec un intervalle de confiance à 95%. Suite à cette analyse, et afin de prendre en compte l'interaction des variables entre elles, une régression logistique (ou analyse multivariée) a été effectuée en considérant comme variable dépendante le type CM d'accès palustre (versus les autres : UM et SMA). Les variables indépendantes proposées dans notre modèle étaient associées à la variable dépendante en analyse univariée avec un $p < 0.2$. Le modèle final ne présente que les variables possédant un $p < 0.05$ en analyse multivariée.

RESULTATS

1. Analyse descriptive des deux bases de données 2014 et 2016

Les données sociales, cliniques et biologiques des patients ont été saisies à partir des questionnaires et des résultats des examens clinico-biologiques issus des laboratoires des centres de santé de Cotonou ainsi que du laboratoire de recherche au Bénin.

1.1) Détermination des groupes cliniques définitifs

Au total, 68 patients (31 UM et 37 CM) ont été recrutés lors de l'étude réalisée en 2014. Après l'analyse des critères clinico-biologiques nécessaires à la répartition des enfants dans chacun des deux groupes de paludisme, 30 enfants UM et 29 CM ont finalement été inclus dans l'analyse finale. Les raisons de ces exclusions sont expliquées dans la Figure 13a.

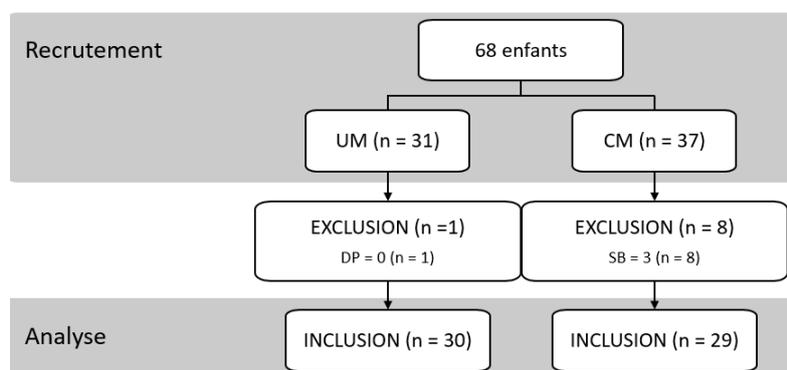


Figure 13a : Diagramme de flux pour les prélèvements 2014

Concernant les prélèvements réalisés en 2016, 119 enfants ont été initialement recrutés : 39 UM, 34 SMA, 15 CM, et 31 PGM (paludismes graves modérés). Ce dernier groupe inclus les patients dont le diagnostic de paludisme à *P. falciparum* a été confirmé et ayant un taux d'Hb strictement supérieur à 5 g/dL et inférieur ou égal à 7 g/dL ou un SB < 5. Bien que ces patients aient été hospitalisés et pris en charge à l'hôpital HOMEL avec un diagnostic de paludisme grave, ils n'ont pas pu être inclus dans un des 3 groupes de cette étude, nous avons donc décidé de ne pas les prendre en compte dans notre analyse. Après un examen plus précis des données, 32 patients UM, 29 SMA et 13 CM ont finalement été inclus dans notre analyse finale. Les raisons de ces exclusions sont décrites dans la Figure 13b.

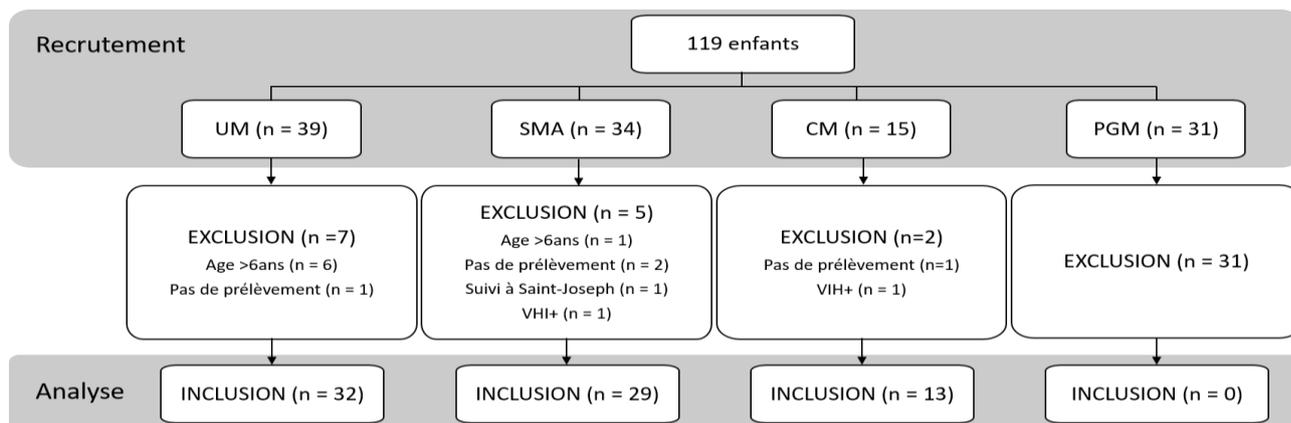


Figure 13b: Diagramme de flux pour les prélèvements 2016

1.2) Comparaison des prélèvements 2014 et 2016 à J0

Les deux groupes de paludisme simple issus des prélèvements de 2014 et 2016 (respectivement UM₁₄ et UM₁₆) ont été analysés à partir de variables communes afin de déterminer s'ils étaient comparables de manière à les regrouper, ou non, pour l'analyse finale. Après une analyse des critères de base, une différence significative a été observée concernant l'âge des enfants et la densité parasitaire à J0 (Tableau 6a). De même, pour les deux groupes de neuropaludisme inclus en 2014 et 2016 (respectivement CM₁₄ et CM₁₆), une différence significative a été observée entre les densités parasitaires à J0 (Tableau 6b).

Tableau 6a : Comparaison des données sociales, cliniques et biologiques entre les patients atteints de paludisme simple en 2014 (UM₁₄) et 2016 (UM₁₆)

Variables	UM 14		UM 16		p
	n	n total = 30	n	n total = 32	
Age (mois)	30	21 (13-36)	31	36 (18-60)	0.0015*
Sexe (M/F)	30	56-7-43,3	32	46.9-53,1	ns†
Température (°C)	30	37,7 (37,0-38,7)	16	37,6 (37,2-37,8)	ns*
DP J0	30	767 (120-6 900)	30	5167 (1 600-17 176)	0.0057*

DP = densité parasitaire à J0

Variables quantitatives : médiane (25-75^{ème} percentiles). Variables qualitatives : pourcentages

*Test de Mann Whitney ; †Test du Chi² ; ns = non significatif ; seuil de significativité : p < 0.05

Tableau 6b : Comparaison des données sociales, cliniques et biologiques entre les patients atteints de neuropaludisme en 2014 (CM14) et 2016 (CM16)

Variables	CM 14		CM 16		p
	n	n total = 29	n	n total = 13	
Age (mois)	29	30 (17-48)	13	34 (29-44)	ns*
Sexe (M/F)	29	51,7-48,3	13	69,2-30,8	ns†
Poids J0 (kg)	29	11 (9,0-13,3)	11	12,0 (9,4-13,0)	ns*
Température (°C)	29	38,6 (38,0-39,1)	12	38,3 (37,8-38,9)	ns*
MI (oui %)	29	96,6	8	87,5	ns†
SB J0	29	2,0 (1,0-2,0)	13	2,0 (2,0-2,0)	ns*
DP J0	29	680 000 (60 114-2 440 000)	13	24 531 (2 646-257 618)	0.016*
Hb J0	29	5,5 (4,2-6,9)	12	5,0 (3,8-6,1)	ns*
Glycémie J0	27	0,8 (0,31-1,24)	9	1,0 (0,3-1,5)	ns*

MI = moustiquaire imprégnée ; SB = score de Blantyre ; DP = densité parasitaire ; Hb = hémoglobine
 Variables quantitatives : médiane (25-75^{ème} percentiles). Variables qualitatives : pourcentages
 *Test de Mann Whitney ; †Test du Chi² ; ns = non significatif ; seuil de significativité : p < 0.05

Ces deux critères, âge et densité parasitaire, jouant un rôle critique dans la réponse immunitaire (103), ces 2 groupes seront analysés de façon séparée. De plus, les études statistiques étant encore en cours pour les prélèvements de 2014, seule l'étude réalisée en 2016 dont les données descriptives sont plus détaillées sera présentée dans la suite de cette thèse.

1.3) Recherche des critères sociaux, cliniques et biologiques spécifiques des groupes UM, SMA et CM

Les données sociales, clinico-biologiques, de prise en charge et de traitements ont été récoltées et analysées pour chaque enfant. Les tableaux 7a, 7b, et 7c présentent les résultats pour les échantillons 2016. L'intégralité des informations n'a pas pu être récoltée pour chaque enfant et le nombre de patients par item est indiqué dans les tableaux.

Analyse des données sociales : différentes données sociales ont été analysées : l'âge, le sexe, l'antériorité ou non d'une hospitalisation due à un paludisme, la prise ou non de traitement dans les jours précédents (antipaludiques et autres) et l'utilisation d'une moustiquaire imprégnée comme moyen de prévention (voir Tableau 7a). La comparaison de ces variables entre les trois groupes cliniques indique que le sexe n'a pas d'incidence sur la forme clinique de paludisme dans notre étude. De plus, les enfants du groupe UM étaient plus âgés que les enfants du groupe SMA (avec respectivement 36 et 30 mois, p = 0.036). La même tendance est constatée en analysant le pourcentage d'enfants ayant connu au moins une hospitalisation antérieure pour

paludisme avec 40,7% de réponses positives pour le groupe UM, 7.7% pour le groupe SMA ($p = 0.005$) et 23.1% pour le groupe CM. Ce résultat doit cependant être interprété avec prudence car la variable « hospitalisé précédemment » est liée à l'âge : plus les enfants sont âgés plus la probabilité qu'ils aient déjà subi une hospitalisation pour paludisme est forte (test U de Mann-Whitney, $p = 0,0081$). Aucune différence significative n'a été observée en comparant le pourcentage d'enfants de chaque groupe ayant pris un traitement antipaludique les jours précédents leur hospitalisation. Cependant, le pourcentage d'enfants ayant pris un traitement antérieur à l'hospitalisation autre qu'un antipaludique (antibiotique, tisane, fer, calmant, antiémétique) est multiplié par 2,5 ou plus entre le groupe UM et les deux formes graves (avec 35% pour les UM, 87,5% et 91,0% pour les SMA et CM, respectivement, $p = 0.0002$). Enfin, aucune différence n'a été observée dans l'utilisation des moustiquaires imprégnées entre les groupes.

Analyse des données de prise en charge et de traitements : la durée d'hospitalisation, les traitements donnés dans les deux centres de santé à J0 ainsi que le devenir clinique des patients sont indiqués dans le Tableau 7b. La durée d'hospitalisation augmente significativement avec la gravité des formes cliniques. En effet, si aucun enfant atteint de paludisme simple n'a été hospitalisé, cette durée était de 4 et 6 jours pour les groupes SMA et CM respectivement ($p < 0.0001$). Comme attendu, les traitements antipaludiques dispensés aux malades à J0 varient eux aussi en fonction des formes cliniques de paludisme et donc également en fonction des sites de prise en charge ($p < 0,0001$). Ainsi, 100% des formes graves ont été traités par de l'artésunate IV, un dérivé de l'artémisinine, alors que les accès simples ont été traités en très grande majorité par la combinaison artémether/luméfantine par voie orale (86,7%) et aucun patient n'a reçu de l'artésunate IV. Concernant les autres traitements donnés aux malades, les résultats indiquent que la prescription d'anti-inflammatoires ainsi que les transfusions sanguines sont très largement augmentées chez les paludismes graves avec entre 76% et 100% d'administration d'anti-inflammatoires dans les formes graves contre 16.7% pour les accès simples ($p < 0.0001$). Les transfusions sanguines étaient également très fréquentes pour les deux groupes de paludisme grave (91,7% pour les CM et 100% pour les SMA) alors qu'aucune transfusion n'a été réalisée pour les accès simples ($p < 0,0001$). Parmi les autres traitements administrés aux patients, la prise d'antibiotiques est multipliée par 3 entre le groupe UM et CM avec respectivement 20% et 62,5% ($p = 0.019$). Le devenir clinique des patients est également différent en fonction du groupe clinique ($p = 0.0010$). En effet, si tous les patients atteints de paludisme simple sont sortis de l'hôpital avec l'accord du personnel médical et qu'aucun décès

n'a été notifié dans ce groupe, on observe dans le groupe SMA une létalité de 7.4% et aucun patient sorti contre avis médical, contrairement au groupe CM où 36.4% des enfants sont soit décédés (18.2%) soit sortis contre avis médical (18.2%).

Analyse des données clinico-biologiques : le Tableau 7c compare les données clinico-biologiques entre les trois groupes de patients 2016. Si le poids reste une variable constante entre les formes cliniques, la température axillaire mesurée chez les enfants est quant à elle en corrélation avec la gravité du paludisme ($p = 0,022$) avec une température médiane de $37,6^{\circ}\text{C}$ pour les UM contre $38,0^{\circ}\text{C}$ chez les SMA et $38,3^{\circ}\text{C}$ chez les CM. En revanche, aucune différence significative n'est observée entre les 2 formes sévères. De même, aucune différence n'est observée entre ces deux mêmes groupes en analysant la durée de la fièvre chez l'enfant avant son hospitalisation. Les convulsions, la profondeur et la durée du coma sont corrélés à la gravité palustre ($p < 0.0001$ pour ces trois paramètres) avec un SB médian passant de 5 à 2 et un délai de coma médian passant 0 à 3,0 jours entre les groupes UM et CM. Environ 61,5% des patients CM ont présenté des convulsions avant leur hospitalisation, contre 20% des SMA et 7.4% des UM ($p = 0.0006$). Une fois hospitalisés, des convulsions ont été observées chez 76,9% des CM, 20,8% des SMA et aucune chez les UM ($p < 0.0001$). Le pourcentage des patients présentant un ictère lors de leur admission à l'hôpital est de 9,5% contre 40% dans les groupes SMA et CM respectivement ($p = 0.045$). De même, la densité parasitaire médiane est largement augmentée dans le groupe CM ($24\ 5321/\mu\text{l}$) par rapport au groupe SMA ($2\ 182/\mu\text{l}$, $p = 0.035$). Les taux d'Hb effectués à J0 lors de l'inclusion des enfants sont significativement différents entre les groupes, résultat attendu puisque lié à la définition des différentes formes cliniques. Le taux médian d'Hb est logiquement plus faible dans le groupe SMA par rapport aux UM (respectivement $4,2\ \text{g/dl}$ et $10,7\ \text{g/dl}$, $p < 0.0001$) mais n'est pas statistiquement différent de celui des CM ($5,0\ \text{g/dl}$). L'hématocrite et le nombre de GR dans le sang des patients sont largement inférieurs aux valeurs normales indiquées pour l'enfant dans les deux formes graves. En effet, si la valeur normale chez l'enfant est comprise entre $4,0 \cdot 10^6$ et $5,5 \cdot 10^6\ \text{GR}/\text{mm}^3$, on observe une médiane de $1,81 \cdot 10^6\ \text{GR}/\text{mm}^3$ chez les SMA et de $2,45 \cdot 10^6\ \text{GR}/\text{mm}^3$ chez les CM. De même, l'hématocrite est de 14% et 16% chez les SMA et les CM respectivement, pour des valeurs normales comprises entre 36 et 45% chez l'enfant. De plus, la glycémie n'a pas montré de résultat significativement différent entre les groupes. Enfin, une différence significative est observée entre les 3 formes cliniques en comparant la proportion de chaque groupe sanguin ($p = 0.0068$). En effet, 60% des UM sont du groupe O (56% O+ et 4% O-) alors que chez les SMA on obtient 38.5% (34.6 O+ et 3.9% O-) et chez les CM 44.4%, tous O+.

Synthèse des critères spécifiques des groupes cliniques : le tableau 7d présente une synthèse des critères spécifiques de chaque groupe clinique. Les variables présentant une différence significative entre les 3 groupes par le test de Kruskal-Wallis, et présentant une spécificité de groupe par les comparaisons deux à deux (test U de Mann-Whitney) ont été retenues. Ainsi, seuls les groupes UM et CM présentent des critères socio-cliniques spécifiques.

Tableau 7d : Synthèse des critères socio-cliniques caractérisant les groupes UM et CM en 2016

UM	CM
Prise de traitement (hors antipaludique) moindre les jours précédents l'hospitalisation	Sortie contre avis médical ou décès
Traitement à l'Artemether-Luméfantrine (per os) à J0	Convulsions avant l'hospitalisation
Administration peu fréquente d'anti-inflammatoires à J0	Convulsions à J0
Peu de transfusion sanguine au cours de la prise en charge	Faible SB
Courte durée d'hospitalisation	Délai de retour à la conscience plus long
Plus faible température corporelle à J0	Groupe sanguin O
Plus fort taux d'hémoglobine à J0	

Tableau 7a : Données sociales des 3 groupes de patients présentant un paludisme simple (UM), une anémie sévère palustre (SMA) ou un neuropaludisme (CM), Bénin 2016

	UM		SMA		CM		p (UM/SMA)	p (UM/CM)	p (SMA/CM)	p
	n	n total = 32	n	n total = 29	n	n total = 13				
Age (mois)	31	36 (18-60)	27	30 (14-48)	13	34 (29-44)	0.036*	ns*	ns*	ns ^{\$}
Sexe H/F	32	46,9-53,1	27	51,9-48,1	13	69,2*30,8	ns†	ns†	ns†	ns†
Antériorité d'hospitalisation pour paludisme	27	40.7	26	7.7	13	23.1	0.005†	ns†	ns†	0.0194†
Ttt antipalu reçu les jours précédents	25	24	24	29.2	12	25	ns†	ns†	ns†	ns†
Ttt reçu les jours précédents hors antipalu	20	35.0	24	87.5	11	91.0	0.0003†	0.0028†	ns†	0.0002†
Moustiquaire imprégnée	26	84.6	23	91.3	8	87.5	ns†	ns†	ns†	ns†

Ttt = traitement

Variables quantitatives : médiane (25^{ème}-75^{ème} percentiles) ; Variables qualitatives : pourcentage

*Test de Mann-Whitney ; †Test du Chi² ; \$Test de Kruskal-Wallis ; ns = non significatif ; seuil de significativité p < 0.05

Tableau 7b : Détails de la prise en charge médicale à J0 des 3 groupes de patients présentant un paludisme simple (UM), une anémie sévère palustre (SMA) ou un neuropaludisme (CM), Bénin 2016

	UM		SMA		CM		p (UM/SMA)	p (UM/CM)	p (SMA/CM)	p
	n	n total = 32	n	n total = 29	n	n total = 13				
<i>Antipaludique reçu (molécule)</i>	30		26		11		<0.0001†	<0.0001†	DM	<0.0001†
Artemether-lumefantrine PO	86,7		0		0					
Artemether	6.6		0		0					
Quinine PO	6.7		0		0					
Artesunate IV	0		100		100					
<i>Autres traitements reçus</i>										
Antibiotiques	30	20	12	41.7	8	62.5	ns†	0.019†	ns†	ns (mais p = 0.051)†
Anti-inflammatoires	30	16.7	25	76	9	100	<0.0001†	<0.0001†	ns†	<0.0001†
Transfusion sanguine	30	0	27	100	12	91.7	<0.0001†	<0.0001†	ns†	<0.0001†
Durée d'hospitalisation (jours)	32	0 (0-0)	25	4.0 (3.8-6.0)	9	6.0 (3.8-6.5)	<0.0001*	<0.0001*	ns*	<0.0001\$
<i>Devenir clinique</i>	32		27		11		ns†	0.0003†	0.0264†	0.0010†
Exéat	100		92.6		63.6					
Evadé ou Décédé	0		7.4		36.4					

PO = per os ; IV = intra-veineux

Variables quantitatives : médiane (25^{ème}-75^{ème} percentiles) ; Variables qualitatives : pourcentage

*Test de Mann-Whitney ; †Test du Chi² ; \$Test de Kruskal-Wallis ; ns = non significatif ; seuil de significativité p < 0.05

Tableau 7c : Données clinico-biologiques des trois groupes de patients présentant un paludisme simple (UM), une anémie sévère palustre (SMA) ou un neuropaludisme (CM), Bénin 2016

	UM		SMA		CM		p (UM/SMA)	p (UM/CM)	p (SMA/CM)	p
	n	n total = 32	n	n total = 29	n	n total = 13				
Fièvre avant J0 (jours)	DM	DM	26	5 (4-6)	11	4 (3-7)	DM	DM	ns†	DM
Convulsions avant hospit	27	7.4	25	20	13	61.5	ns†	0.0002†	0.01†	0.0006†
<i>Tableau clinique à J0</i>										
Poids (kg)	18	12.0 (10.0-16.0)	26	10.4 (8.5-13.0)	11	12.0 (9.4-13)	ns*	ns*	ns*	ns ^{\$}
Température (°C)	16	37.6 (37.2-37.8)	23	38.0 (37.4-39.0)	12	38.3 (37.8-38.9)	0.016*	0.017*	ns*	0.022^{\$}
Convulsions	32	0	24	20.8	13	76.9	0.007†	<0.0001†	0.0009†	<0.0001†
SB	32	5 (5-5)	25	5 (4-5)	13	2 (2-2)	0.04*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001^{\$}
Délai de coma (jours)	32	0 (0-0)	26	0 (0-0)	8	3.0 (2.0-3.5)	ns*	<0.0001*	<0.0001*	<0.0001^{\$}
Ictère	DM	DM	21	9.5	10	40	DM	DM	0.045†	DM
Splénomégalie	DM	DM	6	50	2	50	DM	DM	DM	DM
DP / µL de sang	30	5167 (1600-17 176)	29	2182 (636-34 762)	13	24 531 (2 646-257 618)	ns*	ns*	0.035*	ns ^{\$}
<i>Biologie à J0</i>										
Taux d'Hb (g/L)	21	10.7 (9.6-12.1)	28	4.2 (3.5-4.6)	12	5.0 (3.8-6.1)	<0.0001*	<0.0001*	ns*	<0.0001^{\$}
GR (/mm ³ x .10 ⁶)	DM	DM	22	1.81 (1.49-2.25)	4	2.45 (1.75-3.49)	DM	DM	ns*	DM
Hématocrite (%)	DM	DM	19	14 (12-16)	4	16 (15-17)	DM	DM	ns*	DM
Glycémie (g/L)	15	0.9 (0.9-1.0)	12	0.9 (0.5-1.2)	9	1.0 (0.3-1.5)	ns*	ns*	ns*	ns ^{\$}
<i>Groupe sanguin</i>										
	25		26		9		ns†	0.025†	ns†	ns†
							/ns†#	/0.0019†#	/0.0277†#	/0.0068†#
O+	14	56	9	34.62	0	0				
B+	5	20	7	26.92	4	44.4				
A+	4	16	6	23.08	5	55.6				
O-	1	4	1	3.84	0	0				
AB+	1	4	2	7.69	0	0				
AB-	0	0	1	3.85	0	0				

SB = Score de Blantyre ; Hb = hémoglobine ; GR = globules rouges ; DM = donnée manquante

Variables quantitatives : médiane (25^{ème}-75^{ème} percentiles) ; Variables qualitatives : pourcentage

*Test de Mann-Whitney ; †Test du Chi² ; ^{\$}Test de Kruskal-Wallis ; ns = non significatif ; seuil de significativité p < 0.05

Test du Chi² entre les patients O(O+ et O-) et l'ensemble des autres groupes sanguins (A+/B+/AB+/AB-)

1.4) Analyses des données immunologiques de cytométrie pour la recherche de facteurs spécifiques des groupes cliniques

Trois panels ont été réalisés pour chaque échantillon afin d'évaluer la répartition des différentes populations cellulaires (panel 1), l'activation des lymphocytes LT CD8 (panel 2) et l'activation des monocytes (panel 3). Les paramètres spécifiques de chaque groupe ont été mis en évidence et sont présentés dans les Tableaux 8a, 8b, et 8c correspondant respectivement aux panels 1, 2 et 3. L'analyse de ces panels a permis de déterminer les facteurs spécifiques de chaque groupe ou de manière plus large du paludisme grave.

Comme le montre le Tableau 8a, le pourcentage de lymphocytes T est significativement inférieur pour les 2 formes de paludisme grave comparé au groupe UM ($p = 0.0022$ et $p = 0.0059$ avec les SMA et les CM respectivement). Parmi les LT, la répartition des LT CD8 ne semble pas discriminer un groupe des deux autres formes cliniques, cependant, leurs pourcentages sont tout de même supérieurs chez les SMA par rapport aux UM ($p = 0.0396$). De plus, un faible pourcentage de LT CD4 semble être spécifique au groupe SMA ($p < 0.0001$ avec les UM et $p = 0.0015$ avec les CM, Figure 14A). Aucune différence n'est observée dans la répartition des monocytes, lymphocytes B, cellules NK et lymphocytes NKT entre les 3 formes cliniques.

Le panel 2 s'intéresse à la répartition des lymphocytes T et leur état d'activation. L'analyse en cytométrie de la population des LT CD3 a permis de distinguer deux populations, des LT CD3^{low} (exprimant plus faiblement le CD3 et correspondant à des LT immatures), et des LT CD3^{high} (exprimant plus fortement le CD3, LT matures). Les LT CD3^{low} sont plus nombreux dans les formes graves que dans le groupe UM ($p = 0.0045$ et $p = 0.0248$ avec les SMA et les CM, respectivement). Au contraire, les LT CD3^{high} sont moins nombreux dans les formes sévères que dans le groupe UM ($p = 0.0028$ et $p = 0.0224$ pour les SMA et les CM respectivement). De plus, si un fort pourcentage de LT CD8 CD69 est spécifique des SMA ($p = 0.0391$ avec les UM et $p = 0.0249$ avec les CM, Figure 14B), le groupe des CM se caractérise quant à lui par un faible pourcentage de LT CD8 CX3CR1 ($p = 0.0007$ et $p = 0.0099$ avec les UM et SMA respectivement, Figure 15B). Enfin, les formes de paludisme sévère présentent un faible pourcentage de LT CD8 CXCR3 ($p = 0.0055$ et $p = 0.0390$ avec les SMA et CM respectivement).

Le panel 3 s'intéresse aux différentes sous-populations de monocytes et de leur activation. Trois sous-populations de monocytes ont été caractérisées en fonction de leur récepteurs CD14 et

CD16 : les monocytes « classiques » CD14+ CD16-, les monocytes dits « intermédiaires » CD14+ CD16+, et les monocytes « non classiques » CD14low CD16+. Parmi ces sous-populations, seuls les monocytes « intermédiaires » sont caractéristiques d'un groupe avec un pourcentage plus faible chez les UM comparé aux 2 formes graves ($p = 0.0232$ avec les SMA et $p = 0.0078$ avec les CM). Les monocytes CD14+ CD16- CCR2+ considérés comme inflammatoires et les CD14+ CD16+ CCR2- considérés comme résidents, ne se répartissent pas de façon différente entre les groupes. Même constat pour les pourcentages de CD14 CCR2. De plus, le pourcentage de CD14 TLR2 ne permet pas non plus de discriminer les 3 groupes cliniques. Enfin, le pourcentage de monocytes CD14 CD36 est moins important chez les CM ($p = 0.0278$ avec les UM et $p = 0.0188$ avec les SMA, Figure 15A),

Les figures 14 et 15 présentent les facteurs immunologiques spécifiques des groupes SMA (figure 14) et CM (figure 15).

Tableau 8a : Etude de la répartition des différentes populations cellulaires par cytométrie en flux en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

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

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

Tableau 8b : Etude de l'activation des Lymphocytes T CD8 par cytométrie en flux, en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

Panel 2	Critère de comparaison	UM vs SMA*		UM vs CM*		SMA vs CM*		UM vs SMA vs CM [§]	
		Résultat	P	Résultat	P	Résultat	P	Résultat	p
Activation des T CD8	CD8 CD69 (%)	UM < SMA	0.0391		ns	CM < SMA	0.0249	SMA > UM et CM	0.0439
	CD8 CXCR3 (%)	UM > SMA	0.0055	UM > CM	0.0390		ns	UM > SMA et CM	0.01
	CD8 CX3CR1 (%)		ns	UM > CM	0.0007	CM < SMA	0.0099	CM < UM et SMA	0.0043
	CD3low (%)	UM < SMA	0.0045	UM < CM	0.0258		ns	UM < SMA et CM	0.0063
	CD3hi (%)	UM > SMA	0.0028	UM > CM	0.0224		ns	UM > SMA et CM	0.0042

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

Tableau 8c : Etude de l'activation des monocytes par cytométrie en flux, en fonction des 3 groupes cliniques, Bénin 2016

Panel 3	Critère de comparaison	UM vs SMA*		UM vs CM*		SMA vs CM*		UM vs SMA vs CM [§]		
		Résultat	P	Résultat	P	Résultat	P	Résultat	P	
Activation des monocytes	CD14+ CD16- (%)		ns		ns		ns		ns	
	CD14+ CD16+ (%)	UM < SMA	0.0232		UM < CM	0.0078		ns	UM < SMA et CM	
	CD14low CD16+ (%)		ns		ns		ns		ns	
	CD14+ CD16- CCR2+ (%)		ns		ns		ns		ns	
	CD14+ CD16+ CCR2- (%)		ns		ns		ns		ns	
	CD14 TLR2 (%)		ns		ns		ns		ns	
	CD14 CD36 (%)		ns		UM > CM	0.0278	CM < SMA	0.0188	CM < UM et SMA	0.0471
	CD14 CCR2 (%)		ns		ns		ns		ns	

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

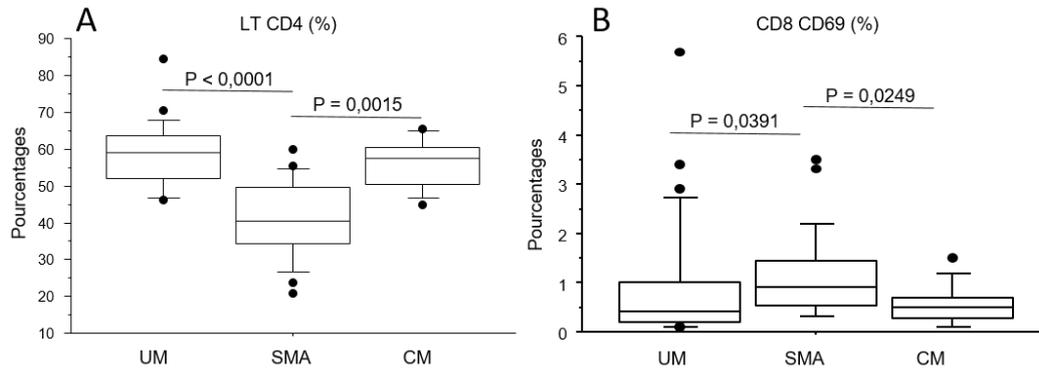


Figure 14 : Paramètres caractéristiques du groupe SMA à J0 par rapport aux deux autres groupes (UM et SMA), Bénin 2016. **A** Pourcentage de lymphocytes T CD4 (LT CD4). **B** Pourcentage de lymphocytes T CD8 CD69.

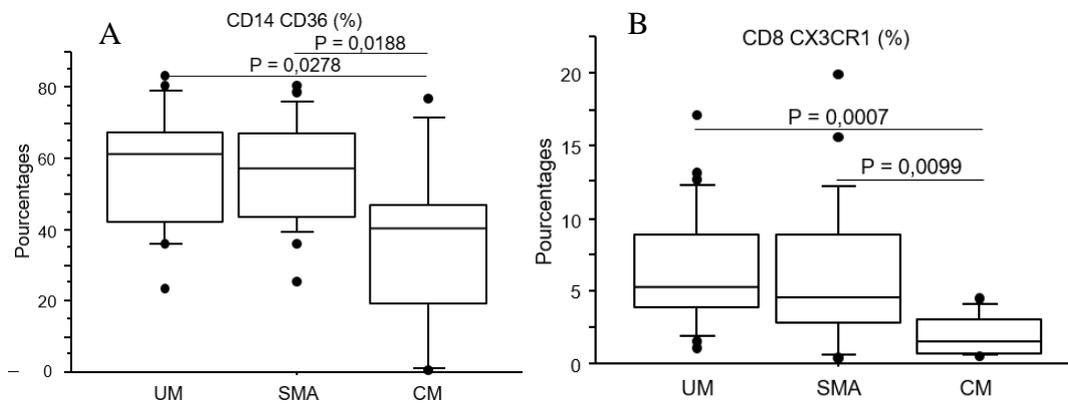


Figure 15 : Paramètres caractéristiques du groupe CM à J0 par rapport aux deux autres groupes (UM et SMA), Bénin 2016. **A** Pourcentage de monocytes CD14 CD36. **B** Pourcentage de lymphocytes T CD8 CX3CR1.

L'analyse des corrélations entre le score de Blantyre et les 2 paramètres spécifiques du groupe CM montre qu'il existe une corrélation positive entre un fort SB et un fort pourcentage de monocytes CD14 CD36 ($p = 0.005$, $\rho = 0.397$) et de lymphocytes T CD8 CX3CR1 (0.0002 , $\rho = 0.503$).

2. Recherche des facteurs de risque et de protection du neuropaludisme

2.1) Analyse univariée (régression linéaire)

Les données socio-cliniques et biologiques ont été analysées par régression linéaire afin de rechercher des facteurs de risque et de protection d'un neuropaludisme. Les variables facteurs protecteurs du neuropaludisme se dégagent : une sortie de l'hôpital avec autorisation du

personnel médical (OR = 0.061, p = 0.0035), un fort pourcentage de lymphocytes T CD8 CX3CR1 (OR = 0.54, p = 0.01) et un fort pourcentage de monocytes CD14 CD36 (OR = 0.95, p = 0.02). A l'inverse, six facteurs de risque ont été identifiés : la prise de calmants à J0 (OR = 7.35, p = 0.01), une transfusion à J0 (OR = 12.2, p = 0.02), une longue durée d'hospitalisation (OR = 1.71, p = 0.0034), la présence de convulsions antérieures à l'hospitalisation (OR = 10.3, p = 0.0009) et de convulsions à J0 (OR = 34, p < 0.0001) et un long délai de coma (OR = 7.5, p = 0.0005).

Tableau 9 : Analyse univariée des facteurs liés au groupe neuropaludisme. Bénin 2016

Variables indépendantes	OR bruts	IC 95%	p	
<i>Données socio-cliniques</i>				
Sexe	2.33	(0.65-8.40)	0.18	
Ttt reçu dans les jours précédant	5.52	(0.65-47.10)	0.12	
Prise de calmants à J0	7.35	(1.53-35.28)	0.01	FDR
Prise d'ATB à J0	4.70	(0.96-22.99)	0.06	
Transfusion à J0	12.22	(1.49-101.05)	0.02	FDR
Durée d'hospitalisation	1.71	(1.19-2.44)	0.0034	FDR
Devenir clinique (exéat)	0.061	(0.009-0.399)	0.0035	Facteur protecteur
Convulsions ant hospit	10.29	(2.61-40.57)	0.0009	FDR
Convulsion à J0	34.00	(6.98-165.7)	<0.0001	FDR
Délai de coma	7.50	(2.41-23.30)	0.0005	FDR
Ictère J0	6.33	(0.92-43.63)	0.06	
DP J0	1.00	(1.00-1.00)	0.19	
Hb J0	0.84	(0.67-1.06)	0.14	
Nombres de GR	2.88	0.724-11.46)	0.13	
<i>Populations cellulaires</i>				
LB (%)	1.06	(0.98-1.15)	0.16	
CD3+ (%)	0.94	(0.88-1.00)	0.05	
<i>Activation des lymphocytes T</i>				
CD8+ (%)	0.94	(0.85-1.03)	0.19	
CD3low (%)	1.04	(0.98-1.11)	0.16	
CD3hi (%)	0.96	(0.90-1.01)	0.13	
CD8 CX3CR1 (%)	0.54	(0.33-0.87)	0.01	Facteur protecteur
<i>Activation des monocytes</i>				
CD14+ CD16+ (%)	1.05	(1.00-1.10)	0.05	
CD14+ CD16- CCR2+ (%)	0.97	(0.93-1.01)	0.16	
CD14+ CD16+ CCR2+ (%)	1.03	(0.99-1.07)	0.19	
CD14 CD36 (%)	0.95	(0.90-0.99)	0.02	Facteur protecteur

OR = Odds Ratio ; IC 95% = intervalle de confiance à 95% ; FDR = facteur de risque

Ttt = traitement ; DP = densité parasitaire ; Hb = hémoglobine ;

2.2) Analyse multivariée (régression logistique)

Suite aux résultats obtenus lors de l'analyse univariée, une régression logistique a été conduite, permettant ainsi de prendre en compte l'interaction des variables entre elles. Cette analyse a été réalisée en considérant comme variable dépendante le type CM d'accès palustre (versus les autres). Les variables indépendantes proposées dans notre modèle étaient associées à la variable dépendante en analyse univariée avec un p < 0.2. Les paramètres socio-cliniques n'ont pas été pris en compte dans l'analyse finale car en étant extrêmement liés au score de Blantyre, ils

participent aux caractéristiques définissant le groupe CM. Trois modèles ont donc été réalisés, correspondant aux trois panels étudiés en cytométrie en flux (Tableau 10). Le modèle 1 ne nous a pas permis d'identifier de facteurs protecteurs ou de facteur de risque du neuropaludisme. En revanche, l'analyse multivariée des paramètres d'activation des lymphocytes indique qu'un fort pourcentage de lymphocytes T CD8 CX3CR1 semble être un facteur protecteur du neuropaludisme (OR = 0.477, p = 0.022). L'analyse des paramètres d'activation des monocytes indique également qu'un fort pourcentage de monocytes CD14 CD36 semble être un facteur de protection du neuropaludisme (OR = 0.907, p = 0.019).

Tableau 10 : Analyse multivariée des facteurs liés au groupe neuropaludisme. Bénin 2016

Variabiles indépendantes	OR ajustés	IC 95%	p
<i>Modèle 1 : Populations cellulaires</i>			
LB (%)	1.013	(0.933-1.100)	0.762
CD3+ (%)	0.954	(0.876-1.038)	0.272
<i>Modèle 2 : Activation des lymphocytes T</i>			
CD8+ (%)	1.068	(0.939-1.021)	0.315
CD3low (%)	1.086	(0.605-1.949)	0.782
CD3hi (%)	1.032	(0.587-1.816)	0.912
CD8 CX3CR1 (%)	0.477	(0.253-0.901)	0.022
<i>Modèle 3 : Activation des monocytes</i>			
CD14+ CD16+ (%)	1.159	(0.963-1.394)	0.118
CD14+ CD16- CCR2+ (%)	0.988	(0.882-1.107)	0.834
CD14+ CD16+ CCR2+ (%)	0.901	(0.755-1.075)	0.246
CD14 CD36 (%)	0.907	(0.836-0.984)	0.019

OR = Odds Ratio ; IC 95% = intervalle de confiance à 95%

DISCUSSION

L'objectif de ce travail était de déterminer un profil cellulaire spécifique du neuropaludisme et ainsi de pouvoir identifier des facteurs de risque et de protection de ce groupe clinique à partir d'une cohorte de patients béninois de moins de 6 ans atteints de différentes formes cliniques de paludisme (accès palustre simple, anémie sévère palustre et neuropaludisme).

Au Bénin, le paludisme dû à *P. falciparum* est la première cause de morbi-mortalité et de recours aux soins chez les jeunes enfants (environ 42% des consultations en centres de santé chez les moins de 6 ans), population la plus vulnérable avec une incidence d'environ 20% (29). A cet âge, les enfants n'ont pas encore développé leur immunité acquise et sont donc plus enclins à développer un paludisme grave. En effet, plusieurs études ont rapporté une diminution de l'incidence des paludismes graves après l'enfance (22,23). Le Sud du Bénin est largement touché par le paludisme et les mois de juin/juillet correspondent à la saison des pluies et de forte endémie palustre. En 2016, durant ces 2 mois, un recrutement exhaustif de patients atteints de différentes formes cliniques de paludisme a été effectué. Le nombre de sujets nécessaires pour cette étude n'a pas été calculé a priori mais un minimum de 30 patients par groupe était attendu selon les études précédentes. Afin d'avoir un maximum d'enfants dans notre étude, ces derniers étaient inclus lors de leur admission à l'hôpital pédiatrique pour les paludismes graves et lors de consultations externes dans un centre de santé pour les paludismes simples. Ces patients ne sont pas représentatifs de l'ensemble des enfants atteints de paludisme dans cette zone, car une part des familles ne peut assurer la prise en charge médicale de leur enfant du fait de contraintes financières et/ou pratiques comme cela a été montré au Nigeria (104,105). Au total, pour l'étude menée en 2016, 74 enfants correspondants à nos critères d'inclusion dans les 3 groupes cliniques prédéfinis ont été inclus dans notre étude, dont 32 UM, 29 SMA et 13 cas de neuropaludisme confirmés. L'objectif de départ a donc été atteint pour les groupes UM et SMA. Pour les CM, le faible nombre de sujets peut être expliqué par la courte saison des pluies en cette année 2016 et par la diminution globale de l'incidence du paludisme en Afrique subsaharienne. En effet, depuis la généralisation des CTA pour le traitement du paludisme et une meilleure utilisation des moustiquaires, l'incidence palustre a diminué de 32% depuis l'an 2000 (2). Ces dernières années au Bénin, le taux de morbi-mortalité a également diminué grâce à la distribution gratuite de moustiquaires imprégnées et à la gratuité de la prise en charge du paludisme pour les enfants de moins de 5 ans (29). Par ailleurs, le nombre de patients des

groupes CM et SMA lors des recrutements a été faussé par des sujets diagnostiqués comme paludisme grave à HOMEL mais que nous avons finalement écarté. La plupart de ces sujets présentaient une Hb inférieure à 7g/dl et une altération de la conscience avec un SB de 3. Ces sujets présentant un état clinique altéré et des critères de gravité tels que définis par l'OMS ne pouvaient être inclus dans le groupe UM. Nous les avons donc exclus de nos groupes pour l'analyse finale.

Concernant les prélèvements sanguins et le suivi des enfants à J21, nous avons rencontré quelques difficultés de nature religieuse et socio-culturelles (évasions de l'hôpital, perdus de vue, refus de prélèvements dus aux croyances,...), justifiant le manque de données pour certains patients. En effet, si pour la grande majorité des patients le premier prélèvement à J0 a été effectué, le nombre de prélèvements recueillis à J21 n'a concerné que 35% des patients inclus à J0. La principale difficulté du suivi des patients était que nous ne pouvions que rarement recontacter les familles et effectuer des rappels (pas d'adresse postale précise ou de téléphone). D'autres difficultés organisationnelles et d'ordre pratique se sont ajoutées à cette campagne de prélèvement (formation hétérogène des personnels médicaux face au diagnostic différentiel du paludisme, prélèvements difficiles sur certains enfants, durée et qualité du transport des échantillons de l'hôpital au laboratoire hétérogène, ...).

Notre étude s'intéresse aux facteurs sociaux, cliniques et biologiques de chacun des groupes cliniques de paludisme. Ces données ont été recueillies via les questionnaires posés aux parents et les examens cliniques et biologiques qui ont suivis. Les biais d'information liés à ce type d'étude sont à prendre en compte lors de l'analyse, avec notamment des biais de mémorisation et de prévarication. En effet, la collecte d'informations issues des questionnaires patients est un recueil rétrospectif de données dont la véracité n'est pas garantie et dont les résultats doivent être interprétés avec précaution.

Dans notre étude, plusieurs facteurs socio-cliniques et biologiques se sont avérés être associés aux 2 formes graves de paludisme (SMA et CM) en 2016. En effet, le pourcentage d'enfants ayant pris un traitement autre qu'un antipaludique avant leur hospitalisation (principalement des antibiotiques) est largement supérieur chez les 2 groupes de paludisme grave. Ce résultat suggère que les enfants présentant des signes de gravité ont reçu un ou plusieurs traitements à large spectre, probablement peu adapté et peu efficace. Cela confirme un problème de diagnostic du paludisme au Bénin, ainsi qu'une mauvaise prise en charge initiale conduisant à une prise retardée des traitements efficaces comme cela a été montré précédemment (105). Concernant les antipaludiques prescrits à J0, l'administration d'artéméther en monothérapie par voie orale est formellement déconseillée par l'OMS qui recommande son usage en combinaison

avec au moins une autre molécule antipaludique afin de limiter l'émergence de résistance parasitaire. Le Ministère de la Santé béninois recommande également l'usage d'artémether-luméfantrine pour le traitement des UM (29). L'artémether en monothérapie a cependant été prescrit à 6.6% des enfants du groupe UM, témoignant d'un manque de respect ou de connaissance des recommandations nationales et de l'OMS. Cette entorse peut être liée à une rupture de stock de CTA, comme cela a été le cas au cours d'études précédentes. La prise d'anti-inflammatoires à J0 et la mise en place d'une transfusion sanguine sont largement augmentées chez les patients atteints des 2 formes de paludisme grave. De même, ces enfants présentent une température corporelle supérieure et un taux d'Hb inférieur aux enfants atteints de paludisme simple, ainsi qu'une durée d'hospitalisation plus longue, ce qui témoigne bien de la gravité de ces accès.

D'autres facteurs clinico-biologiques se sont avérés être associés spécifiquement au neuropaludisme. En effet, la survenue de convulsions antérieures à l'hospitalisation et à J0 était présente respectivement chez plus de 60% et 75% des enfants CM. Les convulsions décrites chez les patients atteints de neuropaludisme sont à différencier des convulsions fébriles retrouvées chez 20% des patients atteints d'anémie sévère palustre. Les enfants atteints de neuropaludisme présentaient également un plus faible SB et un plus long délai de coma. La répartition des groupes sanguins est également différente des deux autres groupes cliniques, avec moins d'enfants de groupe sanguin O chez les CM. Ce dernier résultat est en accord avec plusieurs études suggérant que le groupe sanguin O apporte une certaine protection contre le paludisme grave (46,47). De plus, le nombre de décès et d'évasion est plus important dans le groupe CM que dans les deux autres groupes, avec un peu moins de 20% d'enfants décédés à l'hôpital et un peu moins de 20% d'évasion (dont les raisons sont financières ou en lien avec des croyances et rituels de fin de vie dans les familles). En comparaison, 40% des enfants du groupe CM sont décédés à l'hôpital et plus de 5% d'évasions ont été comptabilisées en 2014. Cette différence de mortalité est certainement due au changement de traitement entre les années 2014 et 2016 : en 2014 les enfants CM étaient encore traités avec de la quinine, alors qu'en 2016 les enfants ont reçu de l'artésunate IV, en accord avec les recommandations nationales de l'OMS (14). Cette meilleure prise en charge peut alors expliquer la diminution de la mortalité dans ce groupe comme cela a été démontré par de nombreuses études comparatives des deux types de traitement (106–108).

Les moyennes des densités parasitaires des 3 groupes cliniques ne révèlent pas de différence significative. Les données recueillies dans le cadre de notre étude en 2016 semblent néanmoins indiquer que la parasitémie est augmentée lors du neuropaludisme, résultat en accord avec les

données de la littérature (109). De plus, cette dernière est certainement sous-estimée dans ce groupe car les parasites sont séquestrés dans les organes profonds. En 2014, les densités parasitaires des enfants atteints de neuropaludisme étaient beaucoup plus élevées qu'en 2016, cette différence pourrait s'expliquer par un délai de traitement plus court en 2016 grâce à la gratuité de la prise en charge des enfants de moins de 5 ans par les CTA mise en place au Bénin depuis quelques années.

L'analyse par cytométrie en flux des différentes populations cellulaires issues des prélèvements de PBMC a permis d'étudier la répartition des lymphocytes et monocytes sanguins. Dans notre étude, les pourcentages de lymphocytes B (LB) et de cellules Natural Killer (NK) sont similaires entre les 3 groupes cliniques. En revanche, les 2 formes graves de paludisme présentent un pourcentage diminué de lymphocytes T (LT). Parmi les LT, aucune différence n'est constatée entre les 3 groupes cliniques dans la proportion de cellules NKT (population cellulaire aux propriétés immunorégulatrices via la production de cytokines pro-inflammatoires), ni dans celle des lymphocytes T régulateurs (sous-population de lymphocytes CD4+ ayant une activité anti-inflammatoire). Les LT ont cependant pu être séparés en deux sous-populations : les LT CD3^{low} (LT immatures) et les LT CD3^{high} (LT matures). Dans notre étude, les 2 formes de paludisme grave présentent un pourcentage plus élevé de LT immatures et un pourcentage plus faible de LT matures comparé au groupe UM. Ce résultat n'a jamais été montré jusqu'à présent et suggère un potentiel blocage de la maturation des lymphocytes T dans les formes sévères du paludisme. Hviid *et al* ont montré une faible expression de CD3 chez des sujets CM comparativement à des sujets UM (110). Les auteurs ont conclu à un état « d'hyporéponse » des LT pendant la phase aiguë de l'accès, rejoignant notre interprétation. De plus, aucune différence du pourcentage de LT CD8 dans le sang périphérique n'a été décrite entre les 3 groupes cliniques dans notre étude, résultat surprenant au regard des résultats de la littérature. En effet, les LT CD8+ sont connus pour jouer un rôle central dans le mécanisme physiopathologique du neuropaludisme. Des études sur des modèles murins de paludisme cérébral montrent un recrutement et une infiltration de LT CD8+ dans les cerveaux des souris infectées, induisant des dommages irréversibles et pouvant alors expliquer les séquelles neurologiques observées dans cette pathologie (66,111). Ainsi, il était plutôt attendu un fort recrutement de LT CD8+ dans ce groupe CM. Nos analyses de sang périphérique ne reflètent donc pas les mécanismes décrits dans le modèle murin et mis en jeu dans les micro-vaisseaux cérébraux. Cependant, aucune étude chez l'homme n'a confirmé cette hypothèse formulée à partir des données expérimentales. Ces résultats pourraient également s'expliquer par cet état « d'hyporéactivité » engendré par les accès sévères et touchant les lymphocytes T. Quoi qu'il

en soit, afin d'avoir des données comparables chez l'homme et la souris, il serait intéressant dans des études futures d'étudier les profils cellulaires des cellules mononuclées du sang périphérique dans le modèle murin.

Dans notre étude, les enfants atteints de neuropaludisme présentaient un pourcentage diminué de LT CD8 CX3CR1 suggérant un rôle délétère de CX3CR1 au cours du neuropaludisme dans notre étude. Le récepteur CX3CR1 interagit avec la chemokine CX3CL1 (ou fractalkine) et favorise alors la migration des cellules qui le portent vers les sites inflammatoires (112). L'axe CX3CR1/CX3CL1 est également impliqué dans la neuroinflammation (113). A ce jour, aucune étude n'a encore mis en évidence le rôle de CX3CR1 dans la pathologie palustre chez l'homme. Il sera intéressant de déterminer le rôle exact de ce récepteur durant un neuropaludisme, et si ce dernier peut être un marqueur potentiel de l'amélioration clinique de cette pathologie. De plus, une diminution du pourcentage de LT CD8 CXCR3 a été observée chez les deux formes de paludisme grave. De même que précédemment, plusieurs études ont mis en évidence le rôle délétère de CXCR3 lors du neuropaludisme expérimental au cours duquel une augmentation de l'expression de ce récepteur à la surface des lymphocytes circulants était observée (114–116). Des études plus précises sont nécessaires afin de déterminer le rôle exact de CXCR3 dans la pathologie palustre.

Les monocytes sont habituellement classés en 3 sous-populations en fonction du niveau d'expression de leurs récepteurs CD14 et CD16. On distingue les monocytes CD14⁺ CD16⁻ appelés monocytes « classiques » ayant une fonction de phagocytose ; les monocytes CD14⁺ CD16⁺ dits monocytes « intermédiaires » possédant à la fois des propriétés pro-inflammatoires avec la production d'espèces réactives de l'oxygène mais aussi de phagocytose ; et enfin les monocytes CD14^{low} CD16⁺ ou monocytes « non classiques » ayant un rôle dans la réponse pro-inflammatoires de l'organisme (117,118). Dans notre étude, aucune différence de fréquence n'a été observée entre les 3 groupes de paludisme concernant les monocytes classiques et non classiques. En revanche le pourcentage de monocytes intermédiaires augmente significativement chez les 2 formes de paludisme graves indiquant une forte activité phagocytaire et pro-inflammatoire dans ces groupes. Une étude menée par notre équipe sur le paludisme placentaire a montré que les monocytes intermédiaires étaient associés à de plus faibles parasitémies, suggérant leur rôle prépondérant dans l'élimination des parasites (80).

De plus, dans notre étude, le pourcentage de monocytes CD14 CD36 diminue significativement lors d'un neuropaludisme. Cette diminution est corrélée à un faible SB reflétant la profondeur du coma. La protéine CD36 participe à la phagocytose non opsonique des GRi par *P. falciparum*, élément essentiel dans l'élimination du parasite et la résolution de l'infection

(119,120). Ainsi, une diminution significative des monocytes CD14 CD36 perturbe l'élimination du parasite par une diminution de la phagocytose. L'étude effectuée au Bénin sur le paludisme placentaire montrait également que l'expression de CD36 était positivement liée à l'issue favorable de l'infection palustre. Dans le cadre de pathologies neuroinflammatoires, la polarisation des monocytes/macrophages vers un phénotype M2 de résolution de l'inflammation est une étape essentielle à l'amélioration clinique. Or, le récepteur scavenger CD36 fait partie des marqueurs de type M2. Nos résultats soulignent donc l'importance du récepteur CD36 des monocytes et proposent qu'une faible fréquence de monocytes CD14 CD36 constitue un facteur de risque du neuropaludisme.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En 2017, le paludisme reste un problème majeur de santé publique. L'infection à *P. falciparum* est responsable de la plus grande majorité des paludismes graves et des décès dans le monde principalement en Afrique sub-saharienne. Même correctement traité, un paludisme grave et notamment le neuropaludisme peut conduire à des séquelles neurologiques dans 4 à 20% des cas. *P. falciparum* infecte l'homme via un moustique vecteur : l'anophèle femelle. Il est essentiel de bien connaître le tableau clinique et biologique du paludisme grave afin d'effectuer un diagnostic et une prise en charge rapide et efficace du patient. Le diagnostic repose sur un examen microscopique du sang du patient (frotti sanguin, goutte épaisse), et sur les Tests de Diagnostic Rapide (TDR). Le paludisme est une urgence médicale car son évolution est imprévisible. De ce fait, il est important de toujours évoquer un paludisme en présence d'une fièvre au retour d'un séjour en zone d'endémie palustre. L'Artesunate IV est actuellement le médicament de référence pour le traitement des paludismes graves chez l'adulte et l'enfant. Cependant la prévention joue un rôle majeur dans la lutte contre le paludisme (moustiquaires imprégnées, pulvérisation d'insecticides, chimioprophylaxie). Le défi majeur de ces dernières années est l'émergence de résistances aux dernières molécules antipaludiques efficaces (dérivés de l'artémisinine), notamment en Asie du Sud-Est. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des formes graves, principalement du neuropaludisme, permettrait d'améliorer la prise en charge des patients et d'identifier potentiellement de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mes travaux portant sur la réponse immune cellulaire dans le neuropaludisme ont été réalisés sur une cohorte de patients béninois de moins de 6 ans atteints de différentes formes cliniques de paludisme (accès palustre simple, anémie sévère palustre et neuropaludisme). Cette étude a permis de mettre en évidence un profil cellulaire spécifique du neuropaludisme qui suggère des facteurs de risque et de protection pour ce groupe clinique.

Ainsi, nos résultats indiquent que la présence de convulsions antérieures à l'hospitalisation et à J0, la profondeur et la durée du coma, le devenir clinique (décès et évacuation versus exéat) ainsi que le groupe sanguin (O versus les autres) sont des paramètres spécifiques du neuropaludisme. L'analyse des prélèvements sanguins montre que le pourcentage de lymphocytes T CD8 CX3CR1 et des monocytes CD14 CD36 sont deux critères spécifiques du neuropaludisme. Parmi tous ces critères, l'analyse multivariée fait ressortir deux facteurs de protection du groupe CM : un fort pourcentage de LT CD8 CX3CR1 et de monocytes CD14 CD36. Un état « d'hyporéactivité » des cellules immunitaires touchant tous les lymphocytes T, associé à une capacité limitée d'éliminer les globules rouges infectés par phagocytose (opsonique et non

opsonique) est également observé durant les formes sévères de paludisme dans le sang périphérique, et particulièrement dans le neuropaludisme.

Ces résultats devront être confirmés par des études impliquant une cohorte plus importante et un suivi de meilleure qualité afin de pouvoir étudier les facteurs d'amélioration clinique. De plus, des études menées en parallèle sur modèles murins sont également essentielles pour identifier les voies d'activation des facteurs de risque ou de protection et d'identifier les cibles thérapeutiques. Ces travaux sont menés actuellement dans le cadre de ma thèse de recherche.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS. Stratégie technique mondiale de lutte contre le paludisme 2016-2030.2015 - [cité 18 mars 2016]. Disponible sur: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176720/1/9789242564990_fre.pdf?ua=1
2. OMS. Paludisme - [cité 26 août 2016]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/>
3. Oluwayemi IO, Brown BJ, Oyedeji OA, Oluwayemi MA. Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria. *Pan Afr Med J.* 2013;15:88.
4. OMS. Guidelines for the treatment of malaria. Third edition. [cité 5 nov 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>
5. Miller LH, Good MF, Milon G. Malaria pathogenesis. *Science.* 24 juin 1994;264(5167):1878-83.
6. Laveran A. Nature parasitaire des accidents de l'impaludisme: description d'un nouveau parasite trouvé dans le sang des malades atteints de fièvre palustre. J.-B. Baillière; 1881. Paris
7. Ross R. On some Peculiar Pigmented Cells Found in Two Mosquitos Fed on Malarial Blood. *Br Med J.* 18 déc 1897;2(1929):1786-8.
8. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 20 août 1976;193(4254):673-5.
9. OMS. Rapport sur le paludisme dans le monde 2016 - résumé. [cité 10 oct 2017]. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254913/1/WHO-HTM-GMP-2017.4-fre.pdf?ua=1>
10. OMS. La lutte contre le paludisme s'améliore pour les personnes vulnérables en Afrique, mais les progrès stagnent à l'échelle mondiale. [cité 4 nov 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/malaria-control-africa/fr/>
11. Cowman AF, Crabb BS. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* 24 févr 2006;124(4):755-66.
12. Grellier P. La différenciation des mérozoïtes de *plasmodium falciparum* et la phase de réinvasion des globules rouges [Internet]. Poitiers; 1990 [cité 5 nov 2017]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/1990POIT2256>
13. Vogel G. The Forgotten Malaria. *Science.* 8 nov 2013;342(6159):684.
14. OMS. La prise en charge du paludisme grave – guide pratique. 3^{ème} édition. [cité 26 août 2016]. Disponible sur: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87012/1/9789242548525>

15. Neri S, Pulvirenti D, Patamia I, Zoccolo A, Castellino P. Acute renal failure in Plasmodium malariae infection. *Neth J Med.* avr 2008;66(4):166-8.
16. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, et al. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet Lond Engl.* 27 mars 2004;363(9414):1017-24.
17. Khim N, Siv S, Kim S, Mueller T, Fleischmann E, Singh B, et al. Plasmodium knowlesi Infection in Humans, Cambodia, 2007–2010. *Emerg Infect Dis.* oct 2011;17(10):1900-2.
18. Singh B, Daneshvar C. Human infections and detection of Plasmodium knowlesi. *Clin Microbiol Rev.* avr 2013;26(2):165-84.
19. Prevention C-C for DC and. CDC - Malaria - About Malaria - Biology - Mosquitoes - Anopheles Mosquitoes. [cité 20 déc 2017]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/>
20. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002 [cité 21 déc 2017]. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/415673a>
21. Médecine tropicale (6e éd.) Gentilini Marc, Caumes Eric, Danis Martin, Bégué Pierre. Librairie Lavoisier. Disponible sur: <https://www.lavoisier.fr/livre/medecine/medecine-tropicale-6e-ed/gentilini/descriptif-9782257203960>
22. Trape JF, Rogier C. Combating malaria morbidity and mortality by reducing transmission. *Parasitol Today Pers Ed.* juin 1996;12(6):236-40.
23. Gonçalves BP, Fried M, Duffy PE. Parasite burden and severity of malaria in Tanzanian children. *N Engl J Med.* 31 juill 2014;371(5):482.
24. Sazama K. Prevention of transfusion-transmitted malaria: is it time to revisit the standards? *Transfusion (Paris).* 12 nov 1991;31(9):786-8.
25. OMS. Il y a vingt ans, plus de 90 000 cas – aujourd’hui, aucun : la Région européenne est exempte de paludisme. 2016 [cité 12 oct 2017]. Disponible sur: <http://www.euro.who.int/fr/media-centre/sections/press-releases/2016/04/from-over-90-000-cases-to-zero-in-two-decades-the-european-region-is-malaria-free>
26. OMS. Factsheet - History of malaria elimination in the European Region. [cité 4 nov 2017]. Disponible sur: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/307272/Facsheet-malaria-elimination.pdf?ua=1
27. Akogbeto M, Modiano D, Bosman A. Malaria transmission in the lagoon area of Cotonou, Benin. *Parassitologia.* déc 1992;34(1-3):147-54.
28. Wang S-J, Lengeler C, Smith TA, Vounatsou P, Akogbeto M, Tanner M. Rapid Urban Malaria Appraisal (RUMA) IV: epidemiology of urban malaria in Cotonou (Benin). *Malar J.* 2 juin 2006;5:45.
29. Ministère de la Santé du Bénin [Internet]. [cité 26 août 2016]. Disponible sur: <http://www.sante.gouv.bj/spip.php?article104>

30. Institut Pasteur. Paludisme – une cartographie mondiale de la résistance à l’artémisinine apporte la confirmation que celle-ci est confinée en Asie du Sud-Est. 2016 [cité 20 déc 2017]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/paludisme-cartographie-mondiale-resistance-artemisinine-apporte-confirmation-que-celle-ci-est>
31. Typologie du paludisme en Afrique. Research Explorer. [cité 6 nov 2017]. Disponible sur: [https://pure.itg.be/en/publications/typologie-du-paludisme-en-afrique\(d15430a3-c588-4000-ba14-0f6fb8f036cd\)/export.html](https://pure.itg.be/en/publications/typologie-du-paludisme-en-afrique(d15430a3-c588-4000-ba14-0f6fb8f036cd)/export.html)
32. Kraemer SM, Smith JD. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Host Microbe Interact* **2006**;9(4):374-80.
33. Claessens A, Adams Y, Ghumra A, Lindergard G, Buchan CC, Andisi C, et al. A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 juin 2012;109(26):E1772-81.
34. Baird JK, Purnomo null, Basri H, Bangs MJ, Andersen EM, Jones TR, et al. Age-specific prevalence of *Plasmodium falciparum* among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. *Am J Trop Med Hyg*. déc 1993;49(6):707-19.
35. Dondorp AM, Lee SJ, Faiz MA, Mishra S, Price R, Tjitra E, et al. The Relationship between Age and the Manifestations of and Mortality Associated with Severe Malaria. *Clin Infect Dis*. 15 juill 2008;47(2):151-7.
36. 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*. sept 1991;45(3):297-308.
37. Garraud O, Mahanty S, Perraut R. Malaria-specific antibody subclasses in immune individuals: a key source of information for vaccine design. *Trends Immunol*. janv 2003;24(1):30-5.
38. Metzger WG, Okenu DMN, Cavanagh DR, Robinson JV, Bojang KA, Weiss HA, et al. Serum IgG3 to the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 is strongly associated with a reduced prospective risk of malaria. *Parasite Immunol*. juin 2003;25(6):307-12.
39. Groux H, Gysin J. Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses. *Res Immunol*. août 1990;141(6):529-42.
40. Schreiber N, Brattig N, Evans J, Tsiri Agbenyega, Horstmann RD, May J, et al. Cerebral malaria is associated with IgG2 and IgG4 antibody responses to recombinant *Plasmodium falciparum* RIFIN antigen. *Microbes Infect*. 1 avr 2006;8(5):1269-76.
41. Perlmann P, Perlmann H, Looareesuwan S, Krudsood S, Kano S, Matsumoto Y, et al. Contrasting functions of IgG and IgE antimalarial antibodies in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. mars 2000;62(3):373-7.

42. Perlmann H, Helmbj H, Hagstedt M, Carlson J, Larsson PH, Troye-Blomberg M, et al. IgE elevation and IgE anti-malarial antibodies in Plasmodium falciparum malaria: association of high IgE levels with cerebral malaria. *Clin Exp Immunol.* août 1994;97(2):284-92.
43. Fleming AF, Storey J, Molineaux L, Iroko EA, Attai ED. Abnormal haemoglobins in the Sudan savanna of Nigeria. I. Prevalence of haemoglobins and relationships between sickle cell trait, malaria and survival. *Ann Trop Med Parasitol.* avr 1979;73(2):161-72.
44. Chippaux JP, Massougbojji A, Boulard JC, Akogbeto M. [Morbidity and severity of malaria attacks in carriers of sickle-cell trait]. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 1992;40(4):240-5.
45. Luzzatto L, Usanga FA, Reddy S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science.* 16 mai 1969;164(3881):839-42.
46. Migot-Nabias F, Mombo LE, Luty AJ, Dubois B, Nabias R, Bisseye C, et al. Human genetic factors related to susceptibility to mild malaria in Gabon. *Genes Immun.* oct 2000;1(7):435-41.
47. Deepa null, Alwar VA, Rameshkumar K, Ross C. ABO blood groups and malaria related clinical outcome. *J Vector Borne Dis.* mars 2011;48(1):7-11.
48. Miller LH. Hypothesis on the mechanism of erythrocyte invasion by malaria merozoites. *Bull World Health Organ.* 1977;55(2-3):157-62.
49. Maxwell CA, Msuya E, Sudi M, Njunwa KJ, Carneiro IA, Curtis CF. Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania. *Trop Med Int Health TM IH.* déc 2002;7(12):1003-8.
50. BEH. *Recommandations_voyageurs_2017.pdf.* [cité 1 nov 2017]. Disponible sur: http://invs.santepubliquefrance.fr/content/download/137167/493411/version/61/file/BEH_Recommandations_voyageurs_2017.pdf
51. VIDAL. *Paludisme : prophylaxie. Traitements.* [cité 6 nov 2017]. Disponible sur: https://www.vidal.fr/recommandations/1470/paludisme_prophylaxie/traitements/#d315e366
52. Cissé B, Sokhna C, Boulanger D, Milet J, Bâ EH, Richardson K, et al. Seasonal intermittent preventive treatment with artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine for prevention of malaria in Senegalese children: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Lancet Lond Engl.* 25 févr 2006;367(9511):659-67.
53. MOSQUIRIX - MesVaccins.net. [cité 6 nov 2017]. Disponible sur: <https://www.mesvaccins.net/web/vaccines/528-mosquirix>
54. First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA - WC500190447.pdf. [cité 18 oct 2017]. Disponible sur: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2015/07/WC500190447.pdf
55. OMS. Malaria vaccine: WHO position paper, January 2016 - Recommendations. *Vaccine.* 3 avr 2017;

56. A Surveillance Study of Diseases Specified as Adverse Events of Special Interest, of Other Adverse Events Leading to Hospitalisation or Death, and of Meningitis in Children in Africa Prior to Implementation of the RTS,S/AS01E Candidate Vaccine - Full Text View - ClinicalTrials.gov. [cité 6 nov 2017]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02374450>
57. White NJ. Preventing antimalarial drug resistance through combinations. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* mars 1998;1(1):3-9.
58. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell.* oct 2000;6(4):861-71.
59. Triglia T, Cowman AF. The mechanism of resistance to sulfa drugs in *Plasmodium falciparum*. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* févr 1999;2(1):15-9.
60. Jambou R, Legrand E, Niang M, Khim N, Lim P, Volney B, et al. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet Lond Engl.* 3 déc 2005;366(9501):1960-3.
61. Flegg JA, Guerin PJ, White NJ, Stepniewska K. Standardizing the measurement of parasite clearance in *falciparum* malaria: the parasite clearance estimator. *Malar J.* 10 nov 2011;10:339.
62. OMS. Status report on artemisinin and ACT resistance (October 2016). [cité 6 nov 2017]. Disponible sur: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/update-artemisinin-resistance-october2016/en/>
63. Pongponratn E, Turner Gdh, Day Npj, Phu Nh, Simpson Ja, Stepniewska K, et al. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1 oct 2003;69(4):345-59.
64. Medana IM, Turner GDH. Human cerebral malaria and the blood–brain barrier. *Blood-Brain Barrier Parasit Dis.* mai 2006;36(5):555-68.
65. Jain K, Sood S, Gowthamarajan K. Modulation of cerebral malaria by curcumin as an adjunctive therapy. *Braz J Infect Dis.* oct 2013;17(5):579-91.
66. Howland SW, Claser C, Poh CM, Gun SY, Rénia L. Pathogenic CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *Semin Immunopathol.* mai 2015;37(3):221-31.
67. Howland SW, Poh CM, Rénia L. Activated Brain Endothelial Cells Cross-Present Malaria Antigen. *PLoS Pathog.* juin 2015;11(6):e1004963
68. Kumar A, Barrett JP, Alvarez-Croda D-M, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ. NOX2 drives M1-like microglial/macrophage activation and neurodegeneration following experimental traumatic brain injury. *Brain Behav Immun.* nov 2016;58:291-309.
69. Becker K, Tilley L, Vennerstrom JL, Roberts D, Rogerson S, Ginsburg H. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* févr 2004;34(2):163-89.

70. Postma NS, Mommers EC, Eling WM, Zuidema J. Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharm World Sci PWS*. août 1996;18(4):121-9.
71. Isah MB, Ibrahim MA. The role of antioxidants treatment on the pathogenesis of malarial infections: a review. *Parasitol Res*. mars 2014;113(3):801-9.
72. Dalko E, Genete D, Auger F, Dovergne C, Lambert C, Herbert F, et al. Heme dampens T-cell sequestration by modulating glial cell responses during rodent cerebral malaria. *Brain Behav Immun*. nov 2016;58:280-90.
73. Tan H-Y, Wang N, Li S, Hong M, Wang X, Feng Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:2795090
74. Luo B, Wang J, Liu Z, Shen Z, Shi R, Liu Y-Q, et al. Phagocyte respiratory burst activates macrophage erythropoietin signalling to promote acute inflammation resolution. *Nat Commun*. 11 juill 2016;7:12177.
75. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. mars 2012;122(3):787-95.
76. McDonough A, Weinstein JR. Neuroimmune Response in Ischemic Preconditioning. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. oct 2016;13(4):748-61.
77. Kim E, Cho S. Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke. *Neurother J Am Soc Exp Neurother*. oct 2016;13(4):702-18.
78. Xia C-Y, Zhang S, Gao Y, Wang Z-Z, Chen N-H. Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *Int Immunopharmacol*. avr 2015;25(2):377-82.
79. Olagnier D, Lavergne R-A, Meunier E, Lefèvre L, Dardenne C, Aubouy A, et al. Nrf2, a PPAR γ alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. *PLoS Pathog*. sept 2011;7(9):e1002254.
80. Aubouy A, Olagnier D, Bertin G, Ezinmegnon S, Majorel C, Mimar S, et al. Nrf2-driven CD36 and HO-1 gene expression in circulating monocytes correlates with favourable clinical outcome in pregnancy-associated malaria. *Malar J*. 2015;14:358
81. Rogerson SJ, Reeder JC, al-Yaman F, Brown GV. Sulfated glycoconjugates as disrupters of *Plasmodium falciparum* erythrocyte rosettes. *Am J Trop Med Hyg*. août 1994;51(2):198-203.
82. Hemmer CJ, Kern P, Holst FG, Nawroth PP, Dietrich M. Neither heparin nor acetylsalicylic acid influence the clinical course in human *Plasmodium falciparum* malaria: a prospective randomized study. *Am J Trop Med Hyg*. nov 1991;45(5):608-12.
83. Warrell DA, Looareesuwan S, Warrell MJ, Kasemsarn P, Intaraprasert R, Bunnag D, et al. Dexamethasone Proves Deleterious in Cerebral Malaria. *N Engl J Med*. 11 févr 1982;306(6):313-9.

84. Hoffman SL, Rustama D, Punjabi NH, Surampaet B, Sanjaya B, Dimpudus AJ, et al. High-dose dexamethasone in quinine-treated patients with cerebral malaria: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis.* août 1988;158(2):325-31.
85. Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Borgstein A, Goldring JD, Hommel M. Intravenous immunoglobulin in the treatment of paediatric cerebral malaria. *Clin Exp Immunol.* déc 1992;90(3):357-62.
86. van Hensbroek MB, Palmer A, Onyiorah E, Schneider G, Jaffar S, Dolan G, et al. The effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor on survival from childhood cerebral malaria. *J Infect Dis.* nov 1996;174(5):1091-7.
87. Varo R, Crowley VM, Siteo A, Madrid L, Serghides L, Bila R, et al. Safety and tolerability of adjunctive rosiglitazone treatment for children with uncomplicated malaria. *Malar J.* 2017;16:215. doi:10.1186/s12936-017-1858-0.
88. Rosiglitazone Adjunctive Therapy for Severe Malaria in Children - Full Text View - ClinicalTrials.gov. [cité 3 nov 2017]. Disponible sur: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02694874>
89. Charunwatthana P, Abul Faiz M, Ruangveerayut R, Maude RJ, Rahman MR, Roberts LJ, et al. N-acetylcysteine as adjunctive treatment in severe malaria: a randomized, double-blinded placebo-controlled clinical trial. *Crit Care Med.* févr 2009;37(2):516-22.
90. Ackerman HC, Beaudry SD, Fairhurst RM. Antioxidant therapy: Reducing malaria severity? *Crit Care Med.* févr 2009;37(2):758-60.
91. Anstey NM, Weinberg JB, Hassanali MY, Mwaikambo ED, Manyenga D, Misukonis MA, et al. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med.* 1 août 1996;184(2):557-67.
92. Yeo TW, Lampah DA, Gitawati R, Tjitra E, Kenangalem E, McNeil YR, et al. Recovery of Endothelial Function in Severe Falciparum Malaria: Relationship with Improvement in Plasma L-Arginine and Blood Lactate Concentrations. *J Infect Dis.* 15 août 2008;198(4):602-8.
93. Nik Kamarudin NAA, Mohammed NA, Mustaffa KMF. Aptamer Technology: Adjunct Therapy for Malaria. *Biomedicines.* janv 2017;5(1):1. doi:10.3390/biomedicines5010001.
94. Maude RJ, Silamut K, Plewes K, Charunwatthana P, Ho M, Abul Faiz M, et al. Randomized Controlled Trial of Levamisole Hydrochloride as Adjunctive Therapy in Severe Falciparum Malaria With High Parasitemia. *J Infect Dis.* 1 janv 2014;209(1):120-9.
95. Casals-Pascual C, Idro R, Gicheru N, Gwer S, Kitsao B, Gitau E, et al. High levels of erythropoietin are associated with protection against neurological sequelae in African children with cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 févr 2008;105(7):2634-9.
96. Picot S, Bienvenu A-L, Konate S, Sissoko S, Barry A, Diarra E, et al. Safety of epoietin beta-quinine drug combination in children with cerebral malaria in Mali. *Malar J.* 24 juill 2009;8:169.

97. Dalko E, Tchitchek N, Pays L, Herbert F, Cazenave P-A, Ravindran B, et al. Erythropoietin Levels Increase during Cerebral Malaria and Correlate with Heme, Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in India. *PloS One*. 2016;11(7):e0158420.
98. Smith HJ, Meremikwu MM. Iron-chelating agents for treating malaria. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2003, Issue 2. Art. No.: CD001474. DOI:10.1002/14651858.CD001474.
99. Newton CR, Crawley J, Sowumni A, Waruiru C, Mwangi I, English M, et al. Intracranial hypertension in Africans with cerebral malaria. *Arch Dis Child*. mars 1997;76(3):219-26.
100. Namutangula B, Ndeezi G, Byarugaba JS, Tumwine JK. Mannitol as adjunct therapy for childhood cerebral malaria in Uganda: a randomized clinical trial. *Malar J*. 24 oct 2007;6:138.
101. Mohanty S, Mishra SK, Patnaik R, Dutt AK, Pradhan S, Das B, et al. Brain swelling and mannitol therapy in adult cerebral malaria: a randomized trial. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. août 2011;53(4):349-55.
102. Gowda NM, Wu X, Kumar S, Febbraio M, Gowda DC. CD36 Contributes to Malaria Parasite-Induced Pro-Inflammatory Cytokine Production and NK and T Cell Activation by Dendritic Cells. *PLOS ONE*. 28 oct 2013;8(10):e77604.
103. Rogier C, Fusaï T, Pradines B, Trape J-F. [Evaluating malaria attributable morbidity in endemic areas]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. juin 2005;53(3):299-309.
104. Onwujekwe O, Ojukwu J, Uzochukwu B, Dike N, Ikeme A, Shu E. Where do people from different socio-economic groups receive diagnosis and treatment for presumptive malaria, in south-eastern Nigeria? *Ann Trop Med Parasitol*. juill 2005;99(5):473-81.
105. Onwujekwe O, Hanson K, Uzochukwu B. Do poor people use poor quality providers? Evidence from the treatment of presumptive malaria in Nigeria. *Trop Med Int Health TM IH*. sept 2011;16(9):1087-98.
106. Sinclair D, Donegan S, Isba R, Lalloo DG. Artesunate versus quinine for treating severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 13 juin 2012;(6):CD005967.
107. Noubiap JJN. Shifting from quinine to artesunate as first-line treatment of severe malaria in children and adults: saving more lives. *J Infect Public Health*. oct 2014;7(5):407-12.
108. Maka DE, Chiabi A, Ndikum V, Achu D, Mah E, Nguetack S, et al. A randomized trial of the efficacy of artesunate and three quinine regimens in the treatment of severe malaria in children at the Ebolowa Regional Hospital, Cameroon. *Malar J*. 31 oct 2015;14:429.
109. Camara B, Diagne-Gueye NR, Faye PM, Fall ML, Ndiaye JL, Ba M, et al. [Malaria severity criteria and prognostic factors among children in Dakar]. *Médecine Mal Infect*. févr 2011;41(2):63-7.
110. Hviid L, Kurtzhals JA, Goka BQ, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, Theander TG. Rapid reemergence of T cells into peripheral circulation following treatment of severe and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Infect Immun*. oct 1997;65(10):4090-3.

111. Yui K. Cross-presentation of malaria antigen by brain microvessels: why CD8+ T cells are critical for the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *EMBO Mol Med.* juill 2013;5(7):899-901.
112. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 19 oct 1998;188(8):1413-9.
113. Freria CM, Hall JCE, Wei P, Guan Z, McTigue DM, Popovich PG. Deletion of the Fractalkine Receptor, CX3CR1, Improves Endogenous Repair, Axon Sprouting, and Synaptogenesis after Spinal Cord Injury in Mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 29 mars 2017;37(13):3568-87.
114. Van den Steen PE, Deroost K, Van Aelst I, Geurts N, Martens E, Struyf S, et al. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines. *Eur J Immunol.* avr 2008;38(4):1082-95.
115. Palomo J, Reverchon F, Piotet J, Besnard A-G, Couturier-Maillard A, Maillet I, et al. Critical role of IL-33 receptor ST2 in experimental cerebral malaria development. *Eur J Immunol.* mai 2015;45(5):1354-65.
116. Campanella GSV, Tager AM, El Khoury JK, Thomas SY, Abrazinski TA, Manice LA, et al. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25 mars 2008;105(12):4814-9.
117. Antonelli LRV, Leoratti FMS, Costa PAC, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, et al. The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute Plasmodium vivax malaria. *PLoS Pathog.* sept 2014;10(9):e1004393.
118. Mukherjee R, Barman PK, Thatoi PK, Tripathy R, Das BK, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.* 11 sept 2015;5:13886.
119. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Sci Signal.* 26 mai 2009;2(72):re3.
120. Patel SN, Lu Z, Ayi K, Serghides L, Gowda DC, Kain KC. Disruption of CD36 Impairs Cytokine Response to Plasmodium falciparum Glycosylphosphatidylinositol and Confers Susceptibility to Severe and Fatal Malaria In Vivo. *J Immunol.* 15 mars 2007;178(6):3954-61.

Annexe 3a : Note explicative distribuée aux parents avant l'inclusion des enfants dans le projet OpTIMuM

UMR216, IRD : Institut de Recherche pour le Développement
CERPAGE
CHU-MEL : Centre Hospitalier Universitaire de la lagune Mère et Enfant

Projet de Recherche sur le paludisme

Caractérisation des parasites chez le jeune enfant présentant un neuropaludisme comparativement aux accès palustres simples

Le paludisme, présent particulièrement en Afrique, peut être responsable d'une maladie très grave, le neuropaludisme qui se caractérise par une phase de coma. Les jeunes enfants sont particulièrement vulnérables aux accès palustres car ils ne disposent pas d'une immunité naturelle suffisante. Une autre forme grave de la pathologie est l'anémie sévère, à laquelle le jeune enfant est très susceptible. Les enfants acquièrent une immunité protectrice au fil des années et des infections palustres successives.

But du projet : Pour aider au développement d'un vaccin contre le paludisme grave, notre équipe se propose d'étudier les accès graves du paludisme au niveau des parasites et d'évaluer la présence ou non de co-infection bactérienne, comparativement aux accès palustres simples

Conduite de l'étude :

- Si vous acceptez que votre enfant participe à notre étude, nous lui prélèverons une petite quantité de sang veineux à J0 de 4ml et toutes les 8 heures d'1ml sur 24h dans un tube alors qu'il est malade. Nous prélèverons également une petite quantité 21 jours après le diagnostic.
- Le sang servira à caractériser les parasites du paludisme au laboratoire du CERPAGE, à identifier la présence de germe bactérien et à rechercher des anticorps et des marqueurs d'inflammation. Aucune autre étude ne sera réalisée sur le sang de votre enfant.
- Votre enfant sera normalement pris en charge par le service de pédiatrie du CHU-MEL. Le projet n'intervient pas dans la décision du traitement.
- Pour vous remercier de votre aide dans ce projet, le traitement sera pris en charge sous forme de médicaments à récupérer gratuitement à la pharmacie du CHU-MEL, ainsi que l'examen de la goutte épaisse. Un bon pour un kit de traitement recommandé par l'équipe soignante vous sera donné.

Participation volontaire/Abandon : Votre participation est totalement volontaire et ne vous coûtera rien. Vous pouvez choisir de ne pas participer ou d'arrêter à tout moment. Ceci n'aura aucun effet sur la prise en charge de votre enfant par l'hôpital.

Inconvénients liés à l'étude : La réalisation de prélèvements supplémentaires peut générer un inconfort pour l'enfant et provoquer l'apparition d'ecchymoses au point de prélèvement. La réalisation d'un point de compression limite néanmoins ce risque. Le risque infectieux est négligeable car le matériel utilisé est stérile et réalisé par du personnel qualifié dans un environnement hospitalier.

Avantage pour le patient : La participation de votre enfant dans ce projet lui offre la prise en charge de la consultation et des examens biologiques que nous réalisons. Les variables obtenues sont des informations précieuses pour les cliniciens, et améliorent la prise en charge de votre enfant. De plus, la consultation 3 semaines après le diagnostic vous est offerte et permet de s'assurer que votre enfant présente une guérison complète de la pathologie.

Confidentialité : Toutes les informations recueillies resteront confidentielles. Les observations médicales seront collectées uniquement par le médecin de votre enfant ou ses assistants. Le nom de votre enfant ne sera pas utilisé pour identifier vos échantillons. Le nom de votre enfant, ainsi que toute autre information confidentielle, ne seront pas utilisés dans un rapport écrit.

Procédure de conservation et de traitement des données : Les données seront conservées à Cotonou au niveau du CERPAGE, et à l'UMR 216 à Paris. Les prélèvements seront processés dans le cadre du protocole de recherche, et seront conservés pour une durée maximale de cinq ans.

Questions : Si vous avez une question au sujet de l'étude, vous pouvez contacter le médecin de votre enfant ou les principaux responsables de cette étude ou les enquêteurs qui sont à votre disposition.

Possibilité de plainte : Tout événement indésirable ou problématique que vous souhaiteriez notifier au cours de cette étude peut librement être rapporté auprès du CER-ISBA.
Contact : CER-ISBA, Champ de foire, ISBA, Cotonou, Tel : 95261770

Médecin :

Responsable de l'étude :

Gwladys Bertin, IRD, 08 BP 841,

Annexe 3b : Consentement éclairé des parents, Projet OpTImuM 2016



CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ

J'ai pris connaissance de l'information ci-dessus, que l'on m'a expliquée.

Je l'ai comprise.

J'ai eu l'occasion de poser des questions.

Une réponse satisfaisante a été apportée à toutes mes questions.

J'accepte délibérément que mon enfant participe à l'étude.

J'accepte que le prélèvement de sang de mon enfant soit conservé à l'Institut de Recherche pour le Développement pour des études complémentaires. Cependant, toute autre utilisation que celle prévue dans le cadre de cette étude fera l'objet d'une information et d'une demande d'avis éthique de la part du Comité d'Éthique de la Recherche de l'ISBA.

J'ai reçu une copie de la note d'information sur l'étude et du consentement éclairé

Je comprends que si j'ai des questions au sujet de cette étude, ou si je décide d'abandonner l'étude, je peux contacter mon médecin ou le principal responsable.

Date :

Le formulaire de consentement a-t-il été lu au participant ? Oui / Non

Nom de l'enfant :

Nom du témoin adulte :

Nom du parent :

Signature du parent :

Signature du témoin :

(empreinte de l'index si la personne ne peut pas signer)

Nom de la personne qui a recueilli le consentement :

Signature de la personne qui a recueilli le consentement :

Annexe 4 : Questionnaire à remplir pour chaque enfant inclus dans le projet OpTIMuM à HOMEL



Projet paludisme cérébral – IRD/CERPAGE/HOMEL

Fiche d'inclusion – à remplir par le médecin de l'hôpital

Date : _____ **HEURE :** _____ Lieu : _____

Nom de la personne remplissant le questionnaire : _____

N° DOSSIER CHU-MEL : _____ **N° IDENTIFICATION CIVIC :** _____

NOM et PRENOM de l'enfant : _____

NOM et PRENOM des parents : _____

Age : _____ (ans + mois)

Sexe [] F [] M

Poids : _____ (Kg)

Numéro cellulaire : _____

Quartier d'habitation: _____ Ville d'habitation : _____

HISTORIQUE DU PALUDISME DE L'ENFANT :

L'enfant a-t-il déjà été hospitalisé pour **un accès palustre grave** ?

OUI NON

Si oui : Combien de fois ? _____

Date de la dernière hospitalisation : _____

L'enfant a-t-il pris des antipaludiques au cours des dernières semaines ?

OUI NON

Si oui, quel(s) médicament(s) ? _____

L'enfant prend-il une prophylaxie antipalustre ? OUI NON

Si oui : quel médicament ? _____

à quelle posologie ? _____

L'enfant dort-il sous moustiquaire ? OUI NON

HISTORIQUE MEDICAL DE L'ENFANT :

Traitement de fond ? si oui lequel

Déparasitage récent ? Si oui date :

PALUDISME ACTUEL :

Depuis quand l'enfant a-t-il de la fièvre ? _____ (jours)

L'enfant a-t-il eu des convulsions ? _____

L'enfant a-t-il reçu un traitement avant de venir à l'hôpital ? OUI NON

Si oui, lequel ? _____

A quelle posologie ? _____

ETAT CLINIQUE (À REMPLIR PAR LE SOIGNANT) :

T° axillaire ou anale (à préciser): _____

L'enfant est-il comateux ? _____ A-t-il des convulsions ? _____

Ictère

Calcul du score de Blantyre :

		Cotation	Résultat
Mouvement des yeux	- Dirigés (suit le visage de la mère)	1	
	- Non dirigés	0	
Réponse verbale	- Appropriée	2	
	- Inappropriée ou gémissements	1	
	- Aucune	0	
Meilleure réponse motrice	- localisation du stimulus douloureux	2	
	- Retrait du membre à la douleur	1	
	- Réponse non spécifique ou absente	0	
	Total	0 - 5	

Décrivez en quelques lignes l'état clinique de l'enfant à son arrivée à l'hôpital :

.....
.....
.....

Diagnostic :

BIOLOGIE

Sang :

Variable	Valeur	Unité
Glycémie		
Hématies		
Leucocytes		
Plaquettes		
GE/DP		
Hémoglobine		
Typage ABO		

LCR :

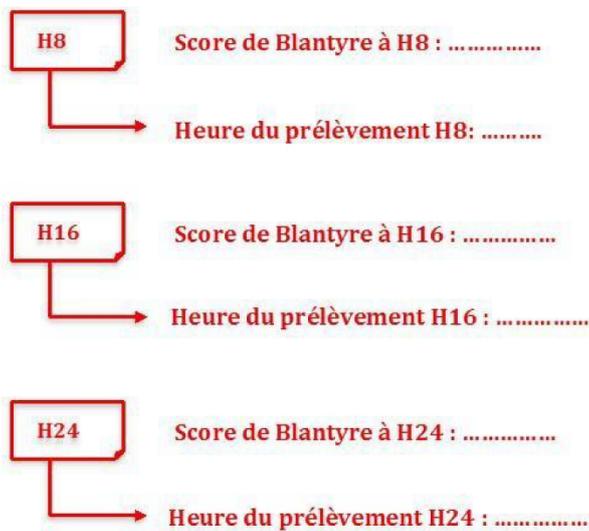
Autre bilan para clinique :

TRAITEMENT

- De l'infection
 - Artesunate
 - Nombre de jour IV
 - Autre antipaludiques
 - Traitement adjuvants :
 - Anticonvulsants [] précisez
 - Autres anti-infectieux [] précisez
 - Antiémétiques [] précisez
 - Antipyrétiques [] précisez
 - SG 10% [] précisez
 - SG 30% [] précisez
 - Transfusion [] précisez
 - Autres traitements []
-

EVOLUTION

- Evaluation du Score de Blantyre après artésunate : H2 H4 H6



Marquer le délai retour à la conscience J1 J2 J3 J7

....

- AUTRE PROBLEME (Hémolyse, insuffisance rénale)

.....
.....
.....

-Période et durée d'hospitalisation

Exéat []

Sortie contre avis médical ou évasion []

Décès []

AUTRES REMARQUES

.....
.....
.....

VISITE POST- HOSPITALISATION A J21 :

Poids : _____ (Kg) T° axillaire ou anale (à préciser): _____

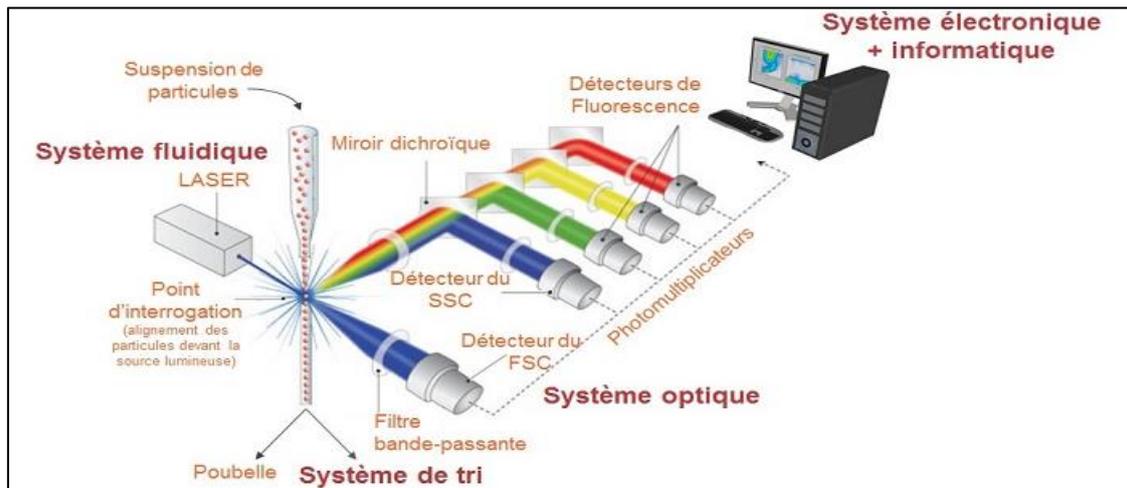
Séquelles : OUI NON

Prélèvement veineux []

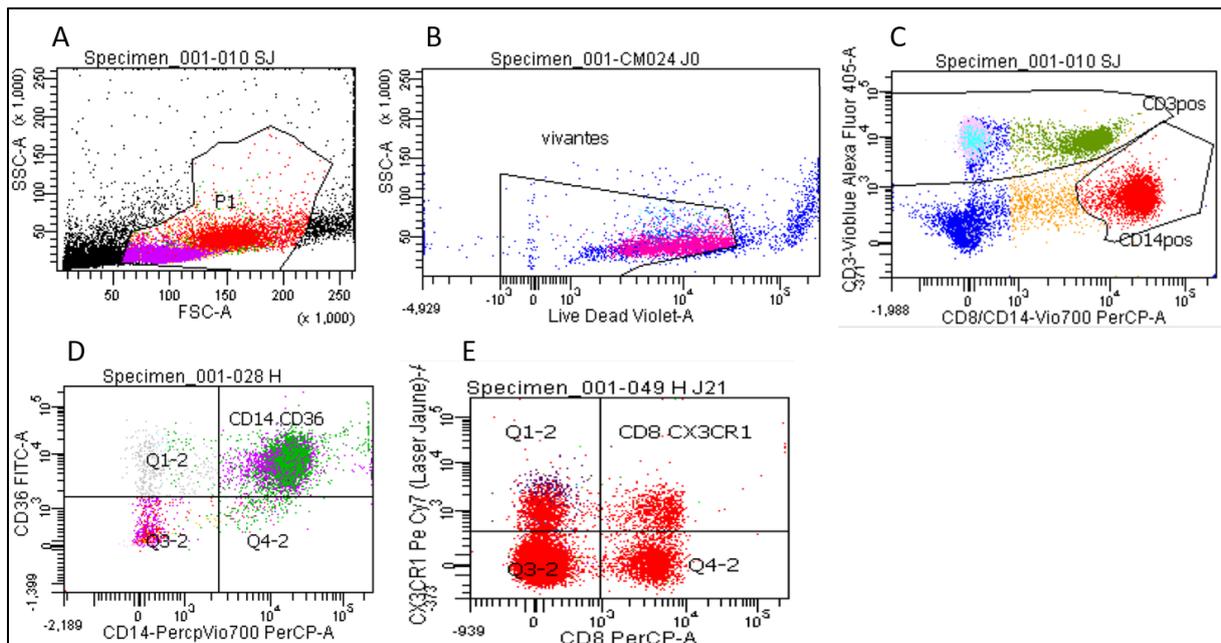
Autres :

.....
.....
.....
.....
.....

Annexe 5 : Principe de la cytométrie en flux (<http://www.univ-reims.fr>)



Annexe 6 : Stratégie d'analyse hiérarchique des échantillons, ou « gating ». **A** Identification des différentes populations cellulaires en fonction de leur taille (FSC) et de leur granulosités (SSC), les points rouges représentent les cellules marquées par l'anticorps CD14+ (monocytes), les points violets représentent les cellules marquées par l'anticorps CD3 (lymphocytes). **B** Discrimination des cellules vivantes et mortes grâce à l'anticorps Live-Dead marqueur de mortalité cellulaire. **C** Dans le panel 1 : Exemple d'identification des cellules CD14+ (monocytes) et CD3+ (lymphocytes). **D** Dans le panel 2 : Exemple d'identification des cellules CD14+ CD36+ parmi les cellules vivantes. **E** Dans le panel 3 : Exemple d'identification des cellules CD8+ CX3CR1+ parmi les CD3+



L'université n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses.

Les opinions doivent être considérés comme propres à leurs auteurs.

Vu et permis d'imprimer

Montpellier, le

P/ le Président de l'Université de Montpellier et par délégation
le Directeur d'U.F.R.

Vers la compréhension de l'immunité cellulaire dans le paludisme cérébral

Towards understanding cellular immunity in cerebral malaria

RESUME

En 2017, le paludisme reste un problème majeur de santé publique. Même correctement traité, un paludisme grave et notamment le neuropaludisme peut conduire à des séquelles neurologiques ou au décès du patient. Le paludisme est une urgence médicale car son évolution est imprévisible. Il est donc essentiel d'effectuer un diagnostic et une prise en charge rapide et efficace du patient. Le défi majeur de ces dernières années est l'émergence de résistances aux dernières molécules antipaludiques efficaces (dérivés de l'artémisinine), notamment en Asie du Sud-Est. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques des formes graves, principalement du neuropaludisme, permettrait d'améliorer la prise en charge des patients et d'identifier potentiellement de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le neuropaludisme se caractérise par une inflammation du cerveau qui peut évoluer soit vers une aggravation neurologique, soit vers une résolution de l'inflammation. Cette étude porte sur la réponse immune cellulaire au cours d'un neuropaludisme. L'objectif est de déterminer un profil cellulaire immunologique spécifique de la maladie et d'identifier des facteurs de risque et de protection de sa survenue.

Une étude cas-témoins a été menée à partir d'une cohorte de patients béninois de moins de 6 ans atteints de différentes formes cliniques de paludisme (accès palustre simple, anémie sévère palustre et neuropaludisme) au cours de deux saisons de transmission (2014 et 2016)

Au total, 74 enfants ont été inclus dans l'étude en 2016, dont 13 neuropaludismes. L'analyse des critères socio-cliniques et biologiques indique que la présence de convulsions antérieures à l'hospitalisation et à l'inclusion, la profondeur et la durée du coma, le devenir clinique (décès, évacuation ou exéat) ainsi que le groupe sanguin (différent de O) sont des paramètres spécifiques du neuropaludisme. L'analyse multivariée de la réponse immune cellulaire montre que de forts pourcentages de lymphocytes T CD8 CX3CR1 et de monocytes CD14 CD36 sont deux facteurs protecteurs du neuropaludisme. Un état « d'hyporéactivité » touchant les lymphocytes T est également observé durant les formes sévères de paludisme dans le sang périphérique.

Cette étude apporte un nouvel éclairage sur le rôle des récepteurs CX3CR1 et CD36 au cours du neuropaludisme, respectivement portés par les lymphocytes T CD8 et les monocytes. Des études complémentaires portant sur des cohortes plus importantes et sur modèles murins seront nécessaires pour approfondir le rôle de ces deux récepteurs.

Mots clés : neuropaludisme, inflammation, coma, convulsion, lymphocytes T, monocytes, Bénin, enfants