

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	1
SIGLES ET ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION	6

<i>Première partie : GENERALITES SUR LE PALUDISME</i>

I. HISTORIQUE ET DEFINITION	8
I.1. Définition	8
I.2. Historique.....	8
II. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE	10
II.1. Répartition du paludisme.....	9
II.1.1. Dans le monde.....	10
II.1.2. Au Sénégal.....	11
II.2. Aspects du paludisme en milieu urbain.....	13
II.3. Hôtes et biologie des <i>Plasmodiums</i>	15
II.3.1 Agent pathogène.....	15
II.3.2 Vecteurs	15
II.4. Cycle évolutif du parasite.....	16
II.4.1 Phase sexuée ou sporogonie chez l'anophèle	16
II.4.2 Phase asexuée ou schizogonie chez l'homme	17
II.4.2.1 Schizogonie pré ou exo-érythrocytaire.....	17
II.4.1.2 Schizogonie érythrocytaire.....	17
III. MEROZOÏTE ET SES QUELQUES ANTIGENES	20
III.1. Ultra-structure du mérozoïte.....	20
III.2. Quelques antigènes.....	21
III.2.1 Merozoïte Surface Protein 1 (MSP1)	21
III.2.2 Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1)	23
IV. PATHOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE	24
IV.1. Accès palustre simple.....	24

IV.2. Formes graves du paludisme.....	25
IV.2.1 Définition et critères du paludisme sévère.....	25
IV.2.2 Physiopathologie du paludisme sévère.....	27
IV.2.2.1 Aspects physiopathologiques liés au parasite.....	27
IV.2.2.2 Aspects physiopathologiques liés à l'hôte.....	28
IV.2.3 Manifestations cliniques et biologiques.....	30
IV.2.3.1. Atteinte neurologique ou neuropaludisme	30
IV.2.3.2. Défaillance cardiovasculaire.....	30
IV.2.3.3. Acidose métabolique.....	31
IV.2.3.4. Atteinte rénale.....	32
IV.2.3.5. Atteintes hématologiques	32
IV.2.3.6. Hyper parasitémie.....	33
IV.2.3.7. Atteinte hépatique.....	33
IV.2.3.8. Hypoglycémie.....	33
V. IMMUNITE ANTI-PALUSTRE	34
VI.1 Notion de prémuniton	34
VI.2 Réponse immunitaire innée	35
VI.3 Réponse immunitaire acquise.....	36
VI. HYPOTHESE ET STRATEGIE D'APPROCHE DU TRAVAIL.....	38

<i>Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE</i>

I. CADRE D'ETUDE	39
II.1. Caractères géo-climatiques.....	39
II.2. Endémicité palustre	39
II.3. Population d'étude	40
II. MATERIEL ET METHODES.....	41
II.1. Matériel.....	41
II.1.1. Matériel de laboratoire.....	41
II.1.2. Tampons et réactifs chimiques.....	41

II.1.3. Matériel biologique.....	42
II.1.3.1. Sérums témoins systématiques.....	42
II.1.3.2. Antigènes étudiés	43
II.1.3.2.1. Extraits de mérozoïtes de <i>P.falciparum</i>	43
II.1.3.2.2. Les protéines recombinantes	44
II.2. Méthodologie.....	45
II.2.1. Technique de diagnostique.....	45
II.2.1.1. Frottis sanguin.....	46
II.2.1.2. Goutte épaisse.....	47
II.2.2. Technique ELISA.....	48
II.2. 3. Analyses statistiques des résultats	50
III. RESULTATS	51
III.1. Caractéristiques de la population d'étude.....	51
III.1.1. Données générales de la population d'étude	51
III.1.2. Caractéristiques clinico-biologiques de la population d'étude	52
III.2. Evolution des réponses anticorps contre les antigènes étudiés.....	53
III.2.1. Evolution des réponses Ac suivant la gravité des accès palustres...53	
III.2.1.1 Comparaison des prévalences de répondeurs.....	53
III.2.1.2 Comparaison des niveaux de réponses anticorps.....	54
III.2.2.Evolution des réponses Ac suivant l'issue du paludisme sévère.....	55
III.2.3.Variations des réponses Ac suivant les caractéristiques hématoparasitologiques des patients.....	56
III.2.3.1. Comparaison suivant la densité parasitaire.....	56
III.2.3.2. Comparaison suivant le taux d'hémoglobine.....	58
III.2.4. Interrelations entre les réponses anticorps dans les deux types d'accès...59	
IV. DISCUSSION.....	61
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	66
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	67
ANNEXES.....	74

LISTE DES FIGURES

ET

TABLEAUX

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures

Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde

Figure 2: Evolution de la morbidité et de la mortalité proportionnelle du paludisme de 2001 à 2009

Figure 3: Cycle de développement de *P. falciparum* chez l'homme et l'anophèle moustique

Figure 4: Structure d'un mérozoïte de *P. falciparum*

Figure 5: Représentation schématique du gène et des différents fragments de MSP1 de *P. falciparum* Représentation schématique de MSP1 de *P. falciparum*

Figure 6: Formation des différents fragments de MSP1 au cours du cycle sanguin de *P. falciparum*

Figure 7: Représentation schématique d'AMA-1

Figure 8: Physiopathologie du paludisme grave

Figure 9: Variations des formes cliniques du paludisme grave suivant l'endémicité palustre et l'âge des patients

Figure 10: Rôle des cellules effectrices et des cytokines dans l'immunité anti-*Plasmodium*

Figure 11: Principales étapes du dosage d'anticorps par ELISA

Figure 12: Comparaison des niveaux réponses en IgM et IgG anti-mérozoïtes (a) ou en IgG anti-MSP1p19 et anti-AMA1 (b) suivant la gravité des accès palustres

Figure 13: Comparaison des niveaux réponses en IgM et IgG anti-mérozoïtes (a) ou en IgG anti-MSP1p19 et anti-AMA1 (b) suivant l'issue des accès graves

Figure 14: Variations des taux d'anticorps suivant la parasitémie dans le paludisme sévère: (a) groupe des patients survivant et (b) groupe des patients décédés

Figure 15: Variations des taux d'anticorps suivant le taux d'hémoglobine: (a) groupe des patients avec paludisme grave et (b) groupe des patients avec paludisme simple

Figure 16: Relation entre les IgG anti-mérozoïtes et les IgG anti-MSP1p19

Liste des tableaux

Tableau I : Critères cliniques de paludisme grave de l’OMS en 2000

Tableau II : Critères biologiques de paludisme grave de l’OMS en 2000

Tableau III : Données générales de la population d’étude

Tableau IV : Caractéristiques clinico biologiques de la population d’étude

Tableau V : Prévalence des répondeurs

SIGLES
ET
ABREVIATIONS

SIGLES ET ABREVIATIONS

Ac: Anticorps.

ADCI : Antibody Dependent Cellular Inhibition.

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

AMA1 : Apical Membrane Antigen-1

BSA (ou SAB): Bovine Serum Albumin

CD: Cluster of Differentiation ou Classe de différenciation

CIVD : Coagulation Intra Vasculaire Disséminée

CR1: Récepteur du complément 1

CRP : Protéine C réactive

CSA : Chondroïtine sulfate A

CSP: Circum Sporozoite Protein

CTL : Lymphocyte T cytotoxique

Cyt : Domaine cytoplasmique

DBL1 α : Domain Binding Like α

DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane

DI : Domaine I

DII : Domaine II

DIII : Domaine III

DO : Densité Optique

EDTA : Ethylène Diamine Tétracétate

EGF-like: Epidermal Growth Factor-like

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Fab : Fragment antigen binding

Fc: Fragment de fixation de l'Ac à la cellule effectrice

FS : Frottis Sanguin

GM-CSF: Granulocyte macrophage- colony stimulating factor

GRp : Globules Rouges parasités

GE : Goutte Epaisse

Hb: Hémoglobine

HPD : Hôpital Principal de Dakar

ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

IPD: Institut Pasteur de Dakar.

kDa: kilodalton

Ly B: lymphocyte B

MGG: May Grunwald Giemsa

MSP: Merozoite Surface Protein

NFS: numération formule sanguine

NK: Natural Killer

NO: Monoxyde d'Azote

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS: Phosphate Buffer Saline.

Pf : Plasmodium falciparum.

PfEMP: *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein

pfGPI: *P. falciparum* Glycosyl Phosphatidyl Inositol

PNLP: Programme National de Lutte contre le Paludisme

PRR: Pattern Recognition Receptor

PS: Paludisme simple

RESA: Ring-Infected Erythrocyte Surface Antigen

RPMI: Milieu de culture cellulaire

rtDO : ratio de DO

SHI: Sérum hyper-immun

SUB: Subtilisine

TGF- β : Transforming growth factor

Th: Cellule T helper

TLR: Toll like recepteur

TM: Domaine transmembranaire;

TMB: 3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine

TNF α : Tumor Necrosis Factor α (facteur de nécrose tumorale).

TPI: Traitement Préventif Intermittent

Treg: Cellule T régulatrice

T $\gamma\delta$: Cellule T $\gamma\delta$

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie parasitaire due à un hématozoaire du genre *Plasmodium*. Il est transmis par un moustique anophèle femelle. Cinq espèces de *Plasmodium* sont capables d'infecter l'homme: *Plasmodium vivax*, *P. malaria*, *P. ovale*, *P. falciparum* et *P. knowlesi* [1]. Seul *P.falciparum* est responsable de la forme grave du paludisme allant de l'altération d'organes vitaux comme le cerveau à des troubles métaboliques et pouvant entraîner la mort [2].

En 2011, 216 millions de cas cliniques de paludisme ont été recensés à travers le monde avec environ 655 000 décès. Cette mortalité concerne surtout les femmes enceintes et les enfants âgés de moins de cinq ans. Selon l'OMS, une diminution de 25% de la mortalité a été observée au niveau mondial par rapport à 2000 [3]. Cette baisse serait le résultat d'une application plus large des stratégies de lutte contre la maladie et d'une amélioration de la prise en charge des cas, mais aussi une conséquence du développement. Pour autant le paludisme se classe au deuxième rang des causes de mortalité derrière la tuberculose et demeure encore un vrai problème de santé publique particulièrement en Afrique sub-saharienne. En raison des résistances grandissantes du parasite aux antipaludiques et du vecteur aux insecticides classiques, l'élaboration d'un vaccin reste une urgence [4]. Après plus de 40 années d'intenses investigations en vaccinologie, aucun vaccin anti-palustre permettant de prévenir la maladie n'est disponible. La complexité des interactions hôte parasite est à l'origine d'un tel échec [5].

Dans les unités de soins intensifs, l'identification et la prise en charge des cas de paludisme grave restent encore difficiles et malgré un arsenal thérapeutique efficace, bien toléré et de plus en plus accessible, il n'est pas facile de réduire la létalité moyenne des accès graves en dessous de 15 à 20% [5]. Il est nécessaire d'améliorer la prévention et la prise en charge des patients par des stratégies basées sur l'utilisation de techniques sensibles permettant de diagnostiquer spécifiquement les accès palustres et d'identifier précocement les formes sévères potentiellement mortelles. Cette nouvelle démarche justifie l'intérêt de la

caractérisation de biomarqueurs du paludisme à visée diagnostique ou pronostique, et fait actuellement l'objet de nombreux travaux. Ces biomarqueurs devront permettre de prévenir afin de contribuer à entraver des processus moléculaires, cellulaires et tissulaires à l'origine des complications sévères, par l'usage d'adjuvants thérapeutiques intervenant aux côtés des antipaludiques. Cependant, seule une meilleure compréhension de la physiopathologie des accès graves permettra d'identifier ces cibles thérapeutiques adaptées et de développer des approches innovantes pour réduire la mortalité palustre. Notre étude entre dans ce cadre et repose sur une analyse des aspects de la réponse immunitaire en anticorps spécifiquement dirigée contre deux antigènes candidats vaccins associés au stade mérozoïte de *P. falciparum*, dans le paludisme hospitalier.

Première partie :

**GENERALITES SUR LE
PALUDISME**

I. DEFINITION ET HISTORIQUE DU PALUDISME

I.1. Définition:

Le Paludisme ou Malaria est une érythrocytopathie fébrile hémolysante, causée par le développement et la multiplication dans le foie puis dans les globules rouges d'un hématozoaire du genre *Plasmodium*, transmis surtout à l'Homme par la piqûre d'un moustique femelle du genre *Anopheles* [6].

I.2. Historique:

Les premières observations rapportées de cas de paludisme remontent à plus de 1500 avant Jésus Christ en Chine puis dans l'Ancienne Egypte. Les premières références chinoises connues parlent de démons armés de marteau, du brasero et à la marmite d'eau froide, ces descriptions reflétant les trois phases successives de l'accès palustre simple. Des études récentes basées sur l'analyse de fragment d'ADN ont prouvé que Toutankhamon un ancien Pharaon d'Egypte était atteint du paludisme au moment de son décès (Vers -1327).

C'est plus tard que la nature saisonnière des cas de paludisme fut décrite par Hippocrate [7].

En 1630, la découverte par **Don Francisco Lopez** des vertus curatives de l'écorce de Quinquina (*Cinchona ledgeriana*) initie l'ère du traitement anti-palustre. En effet, ces écorces furent d'abord utilisées au Pérou puis partout dans le Monde pour traiter l'accès palustre simple.

Néanmoins, il faut attendre 1878 avant que l'agent étiologique du paludisme ne soit mis en évidence par **Alphonse Laveran** ayant observé un gamétocyte dans le sang d'un patient souffrant d'accès fébrile. C'est alors le début d'une importante accélération en matière de connaissance du paludisme. Les italiens **Golgi, Marchiafava et Bignami** décrivent trois des cinq agents responsables du paludisme chez l'homme : *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, et *P.*

ovale fut décrit en 1922 par **Stephens** et *P. knowlesi* a été récemment retrouvé chez l'homme [8].

En 1897, **Ronald Ross** apporta la preuve de l'hypothèse selon laquelle les moustiques étaient porteurs de l'agent étiologique du paludisme. Cette découverte repose sur l'identification d'un oocyste du parasite au niveau de la paroi intestinale d'anophèles femelles gorgées sur le sang d'un patient impaludé. Rapidement, les italiens **Grassi** et **Bastianelli** établissent le cycle complet du parasite chez l'homme et confirmèrent que les moustiques du genre Anophèles peuvent être les vecteurs de *Plasmodium*.

La découverte des premiers antipaludiques de synthèse dans les années 1930 a marqué une énorme avance dans la lutte contre le paludisme. A partir d'observations faites précédemment par Guttman en 1891 sur les faibles propriétés antimalariques du bleu de méthylène, les chimistes français Fourneau et Bovet parviennent à synthétiser la rhodoquine, qui fait partie de la série des amino-8-quinoléines.

L'étude de ces amino-8-quinoléines s'accélère fortement par la découverte de leurs effets sur le stade sanguin asexué de *P. falciparum* et de leur inhibition sur le taux de rechute d'une infection à *P. vivax*. Dès 1944, sont mises en évidence l'efficacité remarquable de la chloroquine et celle de l'amodiaquine sur les stades sanguins asexués de *P. falciparum* et de *P. vivax*, ainsi que leur faible toxicité chez l'homme.

En 1939 **Müller** a réalisé que le DDT avait un remarquable pouvoir insecticide. Le premier essai de DDT dans la lutte antipalustre a eu lieu en 1948 à Rome [9].

En 1950, des projets pilotes de pulvérisation de DDT pour lutter contre le paludisme ont pris forme. L'OMS a lancé des programmes d'éradication du paludisme à l'échelle mondiale au milieu des années 1950.

Dans les années 1960, des souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine ont été rapportées à cause de l'utilisation anarchique du médicament.

La quinine restait alors le seul antipaludique permettant le traitement des accès palustres dus aux souches chloroquino-résistantes. Par la suite un nouveau médicament, le *qinghaosu*, extrait de la plante *Artemisia annua* et employé depuis plus de 2000 ans en Chine dans le traitement de fièvres associées au paludisme, a été découvert. Son efficacité contre les formes mortelles de paludisme et contre les souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine a été démontrée. [10]

II. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE

II.1. Répartition du paludisme

II.1.1. Dans le monde

En 2010, 3,3 milliards de personnes environ 50% de la population mondiale ont été exposées à divers degrés au risque de paludisme dans 109 pays. La répartition du paludisme est dépendante des facteurs environnementaux. La maladie se retrouve surtout dans les pays chauds et le niveau de transmission est variable selon les régions (**Figure 1**). L'incidence annuelle de l'infection palustre dans le monde a été de 216 millions de cas en 2010, avec environ 655 000 décès [11]. Ces estimations publiées par l'OMS sont essentiellement fondées sur des rapports de couverture établis par les programmes nationaux de lutte contre la maladie. Selon une évaluation récente le nombre de décès liés au paludisme pendant la même année serait à environ 1.238.000. Il y a donc une sous-estimation des cas mortels qui s'expliquerait par le fait que certains décès ont lieu à domicile, c'est-à-dire en dehors des structures sanitaires surtout en Afrique subsaharienne. Depuis 2000, le nombre de décès dus au paludisme est constamment à la baisse [12].

Avec les moyens de lutte comme l'utilisation de la DDT depuis les années 1950, le paludisme a été éradiqué des zones anciennement impaludées d'Europe et d'Amérique du Nord. Actuellement, les cas diagnostiqués dans ces régions non endémiques sont considérés comme des cas d'importation. Un grand nombre de personnes habitant dans ces zones sont exposés au cours de séjours en zone

endémique. En France, l'incidence du paludisme d'importation a été estimée à 4600 cas, en 2010. Il s'agissait principalement de voyageurs en provenance d'Afrique subsaharienne (91%) et infectés dans 86% des cas par *P.falciparum*. Parmi ces cas, 7,4% étaient des accès palustres sévères avec une létalité de 4,42% [13].

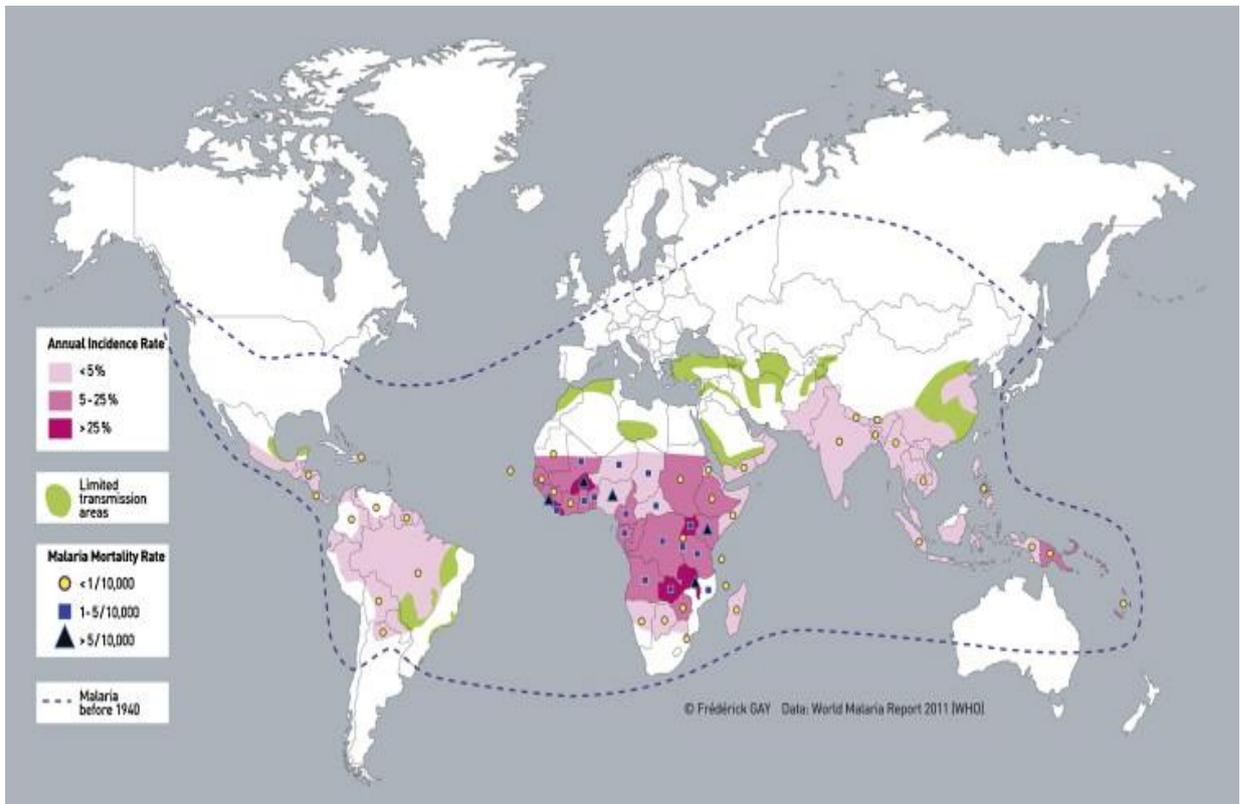


Figure 1: Répartition du paludisme dans le monde [14]

II.1.2. Au Sénégal

Au Sénégal, la mise en place d'un Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) en 1995 a permis une meilleure définition des politiques et stratégies de lutte contre la maladie ainsi qu'une coordination des activités sur l'étendue du territoire. Le taux de morbidité proportionnelle est passé de 33,57 % en 2006 à 3,1 % la fin de l'année 2009 (**Figure 2**). Aussi le taux de mortalité proportionnelle a aussi diminué passant de 18,17% à 4,4%. Au Sénégal comme au niveau international, la lutte contre le paludisme repose surtout sur la lutte anti-vectorielle avec utilisation des insecticides par pulvérisation intra-domiciliaire, des

moustiquaires imprégnées d'insecticides, d'une chimio-prophylaxie ou TPI en 2003, des mesures de prévention individuelles et collectives en 2005, TDR en 2008 [15]

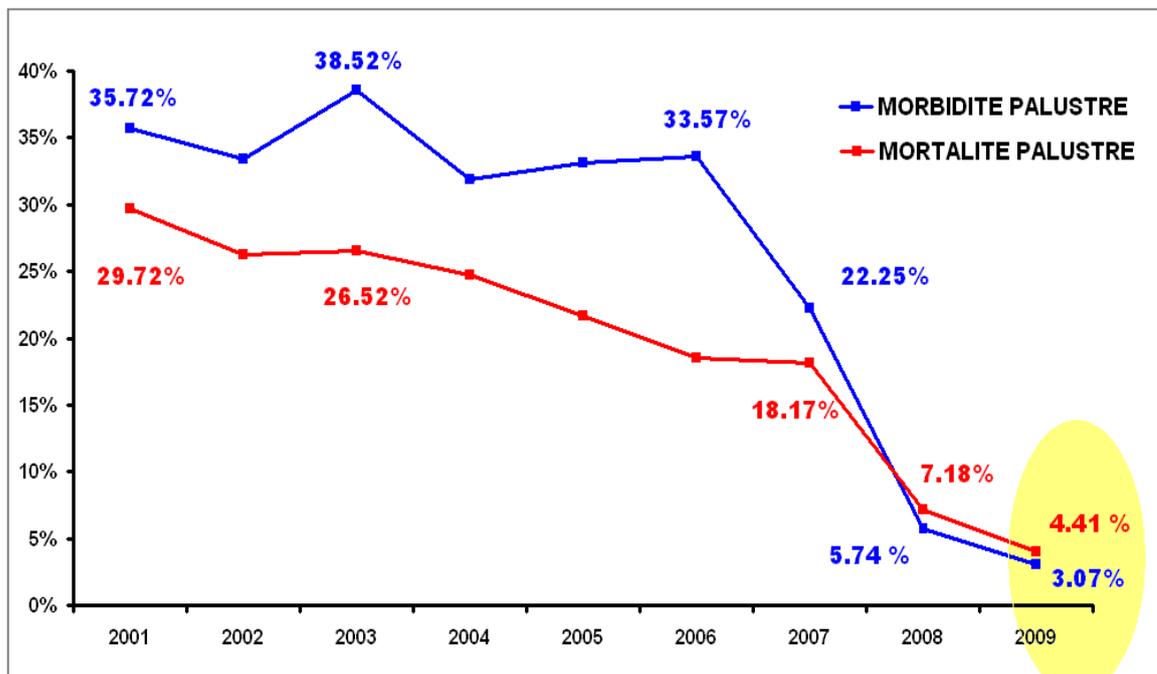


Figure 2: Evolution de la morbidité et de la mortalité proportionnelle de 2001 à 2009 au Sénégal [15]

Néanmoins, le paludisme reste encore un problème de santé au Sénégal et sa transmission s'effectue principalement pendant la saison des pluies. En moyenne, il est responsable de 35% des motifs de consultation. Ce taux diminue lorsqu'on passe du Nord au Sud du pays. Du point de vue épidémiologique, la maladie est caractérisée par une grande hétérogénéité des niveaux d'endémicité et des modalités de transmission. Ainsi la prise en compte de l'endémicité palustre et des paramètres impliqués dans la transmission a permis de distinguer deux principaux faciès épidémiologiques: le faciès tropical au Sud du pays et le faciès sahélien retrouvé au centre et au Nord du pays avec une intensité de transmission faible et un caractère instable accentué par des épisodes épidémiques au cours des années de forte pluviométrie [15].

Sur le plan parasitologique, trois des cinq espèces plasmodiales responsables du paludisme humain sont présentes au Sénégal. Il s'agit de *P. falciparum*, *P. malariae* et de *P. ovale* [16]. La première espèce représente 98% des infestations des vecteurs et de l'homme ; les deux autres très rarement ou souvent rencontrées en association avec *P. falciparum* représentent respectivement 1% et <1% des infections plasmodiales [17]. Plusieurs espèces d'anophèles sont impliquées dans la transmission du paludisme à travers le pays et trois des six espèces du complexe *Anopheles gambiae* *sl* sont retrouvées : *A. gambiae*, *A. melas* et *A. gambiae* *ss.* *A. funestus* et *A. nilii* ont été récemment impliquées dans la transmission [18].

II .2. Aspects du paludisme en milieu urbain

En Afrique sub-saharienne, les zones urbaines regroupent environ 41% de la population. L'essor considérable de l'urbanisation est un phénomène qui occasionne d'importants bouleversements écologiques et sociologiques [19] à l'origine de modifications dans l'épidémiologie du paludisme, avec des formes particulières qui tiennent à la fois à des conditions naturelles spécifiques et à des modifications des modes de vie [20]. Tous les paramètres essentiels tant entomologiques que parasitologiques, immunologiques, cliniques et thérapeutiques sont potentiellement modifiés par ces bouleversements qui accompagnent l'explosion urbaine [21].

- Sur le plan entomologique, la croissance urbaine se révèle hautement défavorable aux anophèles qui constituent les principaux vecteurs du paludisme en Afrique: *Anopheles gambiae*, au profit d'autres espèces de moustiques non vecteurs, notamment *Culex quinquefasciatus* considérée même par certains auteurs, comme un véritable marqueur de l'urbanisation [22]. Des études menées dans les districts sanitaires centre [23] et Sud [24] de la ville de Dakar, montrent que *C. quinquefasciatus* est l'espèce prédominante avec près de 90% du total des collectes, apparaissant ainsi comme le principal responsable de la nuisance signalée par les populations durant la période d'étude. La faune anophélienne peu nombreuse (1,5% des collectes), y est surtout représentée par *A. arabiensis* (97,5%

des femelles d'anophèles) [21]. Une situation comparable est notée à Pikine [20] et dans d'autres villes d'Afrique de l'Ouest et du centre [19,25]. Mais dans chaque centre urbain, en fonction de la nature des terres conquises et des activités qui s'y déroulent, on note des variations de la population vectorielle [21]. En outre, une augmentation des densités vectorielles a été enregistrée dans les zones périphériques qui abritent souvent des gîtes larvaires potentiels, par rapport aux quartiers centraux, très urbanisés où les gîtes sont rares [26].

- Sur le plan parasitologique, on note une diminution de la densité vectorielle entraînant une baisse des taux d'inoculation par personne et par an. Les taux d'impaludation représentés par les indices plasmodiques, sont réduits dans les centres urbains. L'indice plasmodique moyen retrouvé à Dakar est de 0,3% [23,24]; c'est un taux inférieur à ceux des zones rurales de Ndiop (45%) et Dielmo (98%) [27]. Cette baisse de la transmission dans les quartiers urbains explique la lenteur ou l'absence d'acquisition d'une prémunition [19,22]

- Sur le plan clinique, la diminution de la transmission semble aboutir à une réduction de la pathologie palustre. Des études antérieures réalisées à Dakar et à Pikine, ont rapporté des taux de 12 à 13 % représentant la part du paludisme dans la pathologie fébrile [28]. Dans le village de Dielmo, à transmission holoendémique, on recense des taux plus élevés pouvant atteindre 75% [29]. Il convient toutefois de préciser qu'en zone urbaine, les cas de paludisme sévère sont plus fréquents par rapport aux zones rurales hyper-endémiques. Selon certains auteurs, ce constat serait lié à une immunité anti-palustre défectueuse chez les malades concernés [6, 21].

- Sur le plan thérapeutique, il existe une plus grande accessibilité aux soins et aux médicaments antipaludiques en milieu urbain contrairement aux zones rurales encore insuffisamment desservies en structures sanitaires [30]. La conséquence d'une telle situation est un développement rapide de la résistance du parasite aux antipaludiques souvent utilisés de manière anarchique en ville [28,31].

II.3. Hôtes et biologie des *Plasmodiums*

II.3.1. Agent pathogène

Les parasites hématozoaires responsables du paludisme appartiennent à l'embranchement des Sporozoaires ou Apicomplexa, à la classe des Sporozoasida, à l'ordre des Eucoccidiorida, à la Famille des Plasmodiidae et au Genre *Plasmodium* [32].

Cent quarante six espèces du genre de *Plasmodium* ont été répertoriées. Ils sont capables d'infecter divers hôtes: homme, singe, oiseaux et rongeurs. Chez l'homme seules quatre espèces sont communément reconnues comme étant responsables du paludisme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* ; auxquelles s'ajoute maintenant *P. knowlesi*. C'est une espèce zoonotique du singe macaque responsable d'un nombre important d'infection humaine en Asie du Sud-Est [8].

II.3.2. Vecteurs

Au niveau taxonomique, les vecteurs de plasmodium sont des insectes diptères appartenant à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophelinae*. On dénombre environ 500 espèces d'anophèles dans le monde, parmi lesquelles une cinquantaine est capable de transmettre le paludisme à l'homme [33]. En Afrique, une douzaine d'espèces est impliquée dans la transmission. Ces vecteurs du paludisme en Afrique tropicale sont répartis en divers grands groupes:

- **le groupe *gambiae*** avec sept espèces dont deux seulement sont vectrices : *An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis*,
- **le groupe *funestus*** qui renferme neuf espèces dont deux vectrices : *An. funestus s.s.* et *An. rivulorum* assurent la transmission du paludisme,
- **le groupe *nili*** contenant quatre espèces dont trois vectrices : *An. nili s.s.*, *An. carnevalei* et *An. ovengensis* [34,35].

Seuls les deux premiers groupes de vecteurs sont impliqués dans la transmission palustre en Afrique. Chacune de ces espèces a des préférences pour

des biotopes particuliers. Ces espèces présentent une grande capacité vectorielle, expliquant la forte endémicité palustre en Afrique [36].

Seule l'anophèle femelle est hématophage. Elle a une activité nocturne son vol est silencieux et sa piqûre décrite comme indolore par opposition aux piqûres beaucoup plus prurigineuses des autres genres de moustiques [37].

II.4.Cycle évolutif du parasite

Le cycle des *Plasmodium* comporte une phase sexuée ou sporogonie chez l'anophèle femelle et une phase asexuée ou schizogonie retrouvée chez l'homme. Chez l'homme, le parasite est constamment haploïde, avec une étape de multiplication dans les hépatocytes (phase pré ou exoérythrocytaire) et une multiplication intra-érythrocytaire (schizogonie érythrocytaire). Certaines caractéristiques du cycle biologique sont typiques de l'espèce plasmodiale en cause, nous avons défini ci-dessous, le cycle de *P. falciparum* qui demeure la seule espèce étudiée dans ce travail (**Figure 3**).

II.4.1. Phase sexuée ou sporogonie chez l'anophèle

Lors d'un repas sanguin chez un individu infecté, l'anophèle femelle ingère des gamétocytes, qui constituent des formes parasitaires sexuées mâles ou femelles. Dans l'estomac du moustique, ces gamétocytes subissent une maturation qui les transforme en gamètes mâles et femelles haploïdes. La fécondation entre un gamète femelle et un gamète mâle donne un œuf mobile appelé zygote ou ookinète diploïde qui s'implante en dessous de la paroi stomacale du moustique pour former un oocyste. Cette phase diploïde s'achève par des mitoses permettant la formation des sporozoïtes qui gagnent préférentiellement les glandes salivaires de l'anophèle d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'un repas sanguin chez l'hôte. Cette phase du cycle chez le moustique dure 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et les espèces d'anophèles en cause [38].

II.4.2. Phase asexuée ou schizogonie chez l'homme

II.4.2.1. Schizogonie pré ou exo-érythrocytaire

L'infection de l'homme par le *Plasmodium* est initiée par la piqûre de l'anophèle femelle infecté qui inocule des dizaines de sporozoïtes dans les capillaires cutanés. Ces sporozoïtes restent dans le sang circulant pendant une courte durée (30 mn). Certains y seront détruits par les monocytes tandis que d'autres pénétreront activement différents types cellulaires au sein desquels leur développement avortera. Seuls ceux ayant franchi la barrière des cellules de Küpffer du foie et ayant pénétré dans les hépatocytes pourront continuer leur cycle [39].

Dans l'hépatocyte, s'effectue la première prolifération intracellulaire du parasite. Cette multiplication conduit à la formation de plusieurs trophozoïtes qui se transforment par la suite en schizontes intra-hépatiques renfermant de nombreux mérozoïtes. L'éclatement de l'hépatocyte infecté libère les mérozoïtes qui vont passer dans le sang pour infecter les hématies. Cette phase de réplication intra-hépatique est asymptomatique. Elle dure 7 à 15 jours. A la différence des phases hépatiques de *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*, la schizogonie hépatique de *P. falciparum* se caractérise par l'absence de formes de persistance hépatique ou hypnozoïtes. En effet, pour *P. vivax*, *P. ovale*, leurs hypnozoïtes peuvent rester à l'état quiescent pendant plusieurs mois voire années dans le foie [40].

II.4.2.2. Schizogonie érythrocytaire

Les mérozoïtes libérés dans le sang infectent spécifiquement les érythrocytes. Ils montrent une très forte prédilection pour les hématies âgées. Cette invasion des globules rouges initie la phase sanguine asexuée du développement parasitaire. En effet, peu après l'invasion, le mérozoïte se différencie en trophozoïte jeune. C'est une forme en anneau caractérisée par un cytoplasme très fin et qui va par la suite devenir un trophozoïte dit âgé. Ce dernier entreprend des divisions nucléaires pour se transformer en un schizonte plurinucléé. Après une condensation cytoplasmique, le schizonte intra-érythrocytaire éclate en rompant la membrane du GRp. Il libère

dans la circulation sanguine 24 à 32 mérozoïtes, des débris érythrocytaires et parasitaires. De nouvelles hématies sont rapidement infectées par des mérozoïtes qui initient d'autres cycles sanguins. Certains mérozoïtes se différencient ensuite en éléments à potentiel sexuel appelés gamétocytes mâles et femelles qui ne pourront poursuivre leur développement que chez l'anophèle femelle.

L'ensemble du cycle sanguin asexué dure 48h. Contrairement aux autres espèces plasmodiales, les formes tardives de développement dans l'hématie infectée par *P. falciparum*, trophozoïtes âgés et schizontes, sont le plus souvent séquestrées au niveau de certains capillaires périphériques et dans certains organes comme la rate, le poumon et le cerveau ou même le placenta chez la femme enceinte [40].

L'apparition de gamétocytes a lieu généralement dans la deuxième semaine qui suit l'infection; ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. A l'occasion d'une nouvelle piqûre par un moustique, ces gamétocytes mâles et femelles, ingérés avec le repas sanguin, sont à l'origine du cycle sporogonique qui aboutit à la différenciation de sporozoïtes infectieux dans les glandes salivaires de l'anophèle.

Le cycle de *P. falciparum* chez l'homme, représenté sur la figure 3, illustre donc l'existence de divers stades successifs de développement, résidant dans des territoires biologiquement différents, ayant une constitution moléculaire et des besoins métaboliques propres.

La pathologie observée est essentiellement associée à la phase érythrocytaire de l'infection et il n'a pas été attribué de pathologie significative aux sporozoïtes, aux formes hépatiques et aux gamétocytes [41].

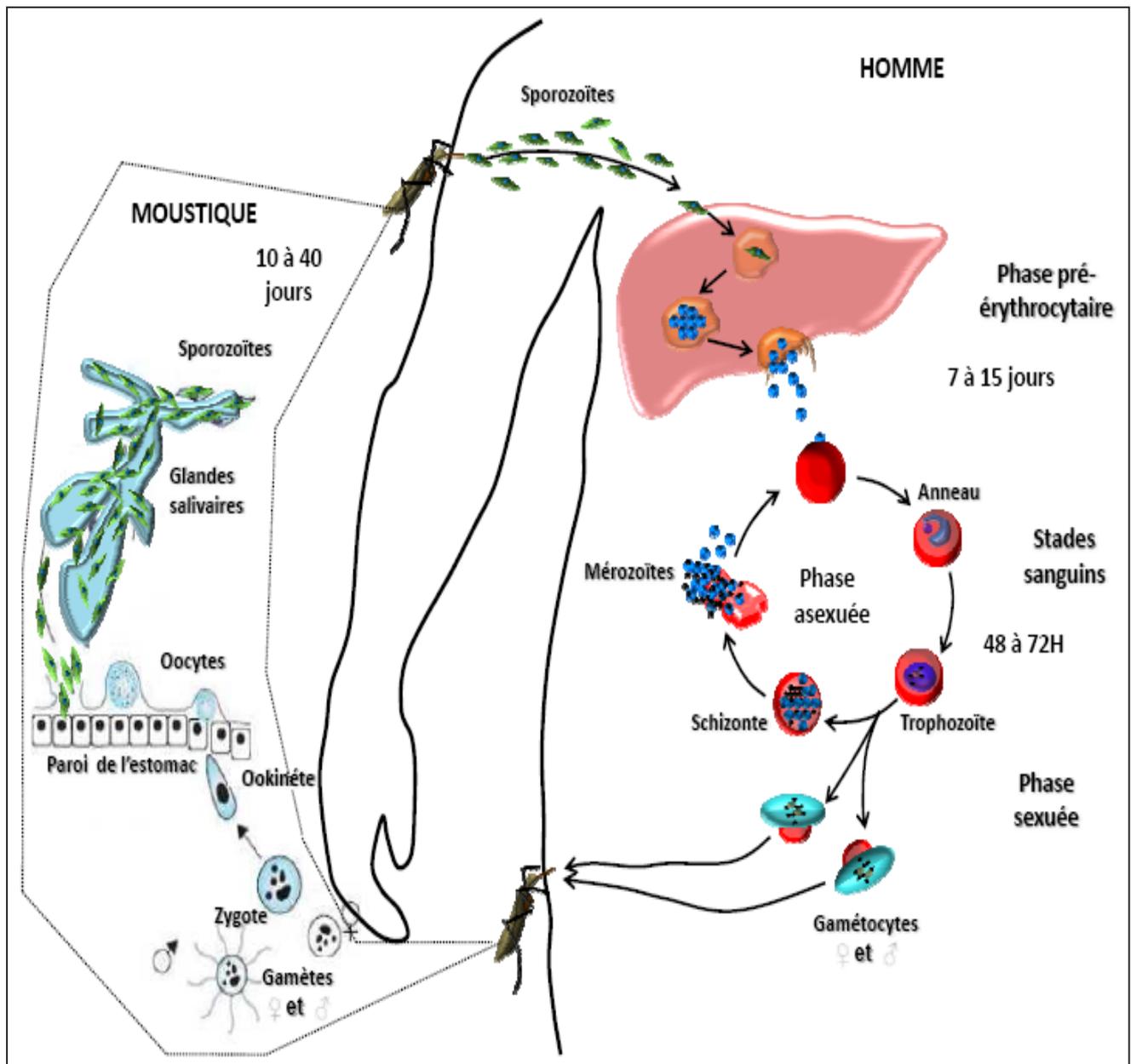


Figure 3: Cycle de développement de *Plasmodium . falciparum* [40].

III. MEROZOÏTE ET SES ANTIGÈNES

Les formes sanguines de *P. falciparum* sont les stades les plus explorés dans la recherche vaccinale. Elles sont surtout à l'origine de la symptomatologie des accès palustres simples et graves. Le stade de mérozoïte est encore le plus étudié et les investigations se sont surtout focalisées sur ses antigènes de surface comme les protéines de type MSP dont MSP1 (Merozoite Surface Protein-1), MSP3, MSP4 mais aussi l'antigène AMA1 (Apical Membrane Antigen-1) qui sont des candidats vaccins en cours d'évaluation. Les antigènes AMA-1 et MSP1-19 ont des zones dans la séquence génétique de *P. falciparum*.

III.1. Ultra-structure du mérozoïte:

Le mérozoïte est la forme libre et invasive du parasite. La plupart des données relatives à sa structure ont été obtenues chez *P. knowlesi*. Les mérozoïtes de cette espèce étant moins fragiles que ceux des autres. La structure des mérozoïtes de *P. falciparum* a été décrite par **Langreth** en 1978 [42]. C'est une petite cellule polarisée de forme ovoïde, avec une faible saillie à bout plat à une extrémité, mesurant environ 1,6 µm de long et 1 µm de large. Malgré sa petite taille, c'est une forme parasitaire très complexe contenant de nombreux organites apicaux impliqués dans le phénomène d'invasion des globules rouges: ce sont les rhoptries, micronèmes et granules denses (**Figure 4**). Le mérozoïte est recouvert d'un manteau, sous lequel, en plus de la membrane plasmique, se trouvent deux autres membranes connectées par un important matériel fibrillaire et reliées au cytosquelette.

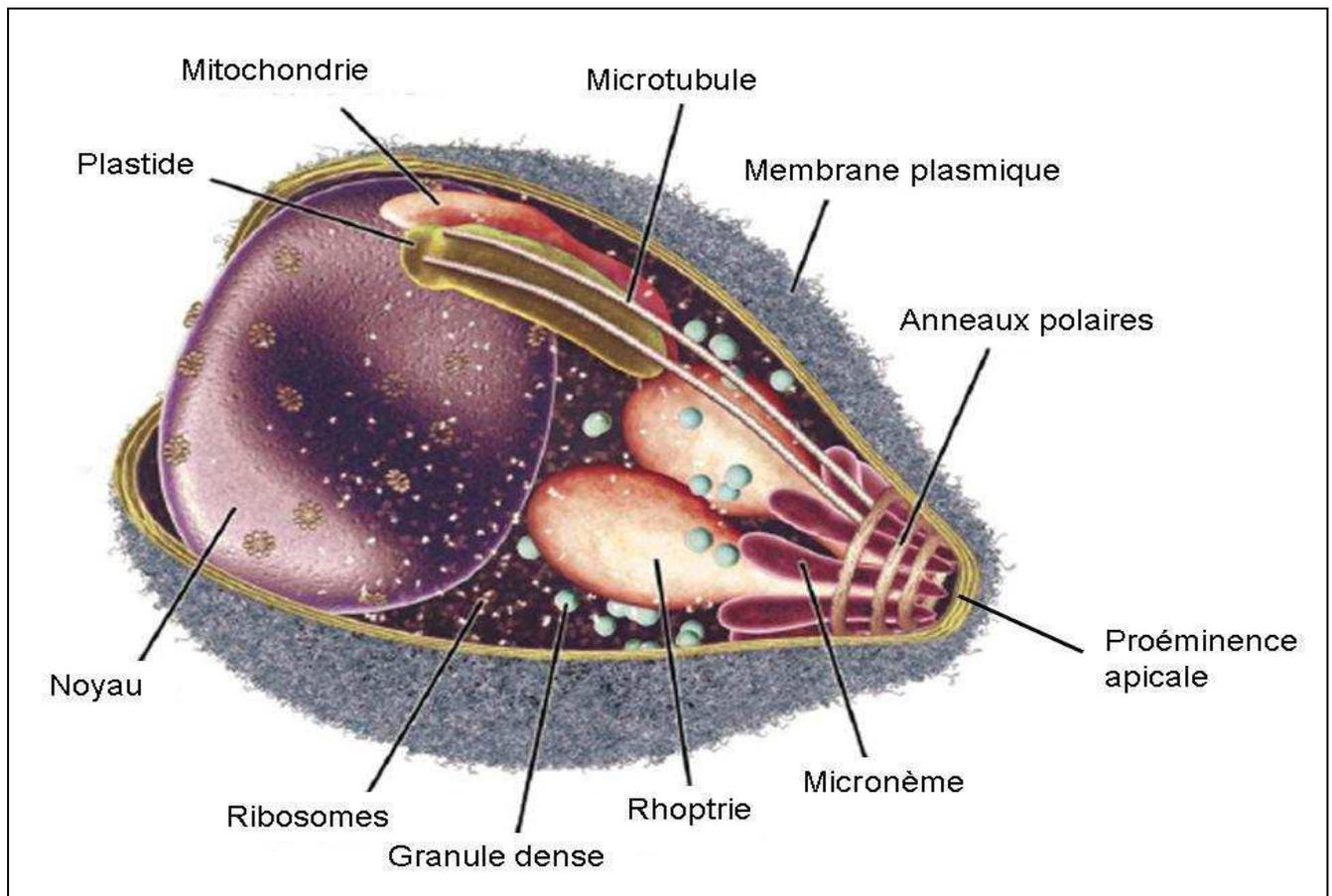


Figure 4: Structure du mérozoïte de *P. falciparum* [43]

Le manteau est épais, hérissé de poils et chaque poil est un bouquet de fines filaments de 2 à 3 nm ancrés par leurs bases au niveau de la membrane plasmique [44]. Les filaments sont utilisés par le mérozoïte pour se fixer sur le globule rouge; ils sont ensuite laissés à la surface de ce dernier après l'invasion [45].

III.2. Quelques antigènes

III.2.1 Merozoïte Surface Protein (MSP1)

C'est une protéine complexe de *P. falciparum* qui est un élément essentiel dans le processus d'invasion des érythrocytes [43]. Elle est synthétisée au cours de la schizogonie sous forme d'un polypeptide précurseur de 200 kDa avant d'être exprimée à la surface du mérozoïte intra-érythrocytaire. L'analyse des séquences des gènes de plusieurs clones de *P. falciparum*, a permis de déterminer sa structure primaire divisée en blocs numérotés de 1 à 17 (**Figure 5**).

Ces blocs sont répartis en trois types: conservés, semi-conservés et variables. Les blocs 1, 3, 5, 12 et 17 sont très conservés, les blocs 4, 6, 8, 10, 14 et 16 sont variables. Le bloc 4 est l'un des plus variables et les blocs 7, 9, 11, 13 et 15 sont semi-conservés [46,47].

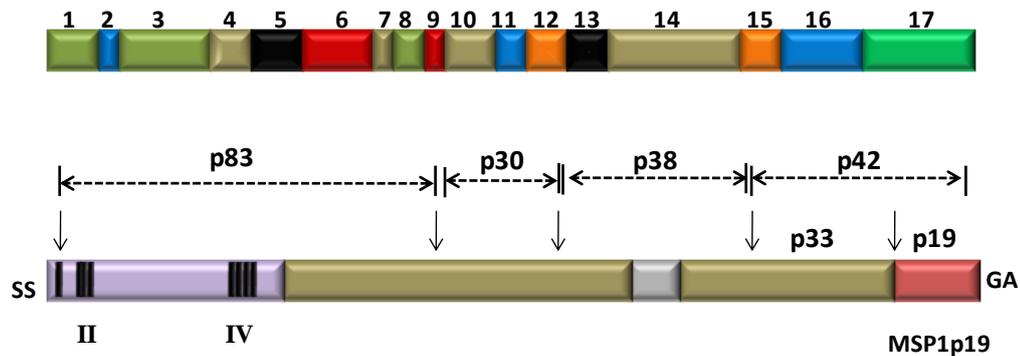


Figure 5 : Représentation schématique du gène et des différents fragments de MSP1 de *P. falciparum* [45, 46].

Après sa synthèse, MSP1 est ancrée à la membrane plasmique du mérozoïte par un glycolipide transmembranaire: le Glycosyl phosphatidyl Inositol (*Pf*GPI). Elle y est associée à d'autres protéines comme MSP6 et MSP7. En présence d'une protéase la subtilisine (SUB1), MSP1 subit une première protéolyse juste avant la rupture des schizontes; pour donner quatre fragments: MSP1-83, MSP1-30, MSP1-38 et MSP1-42 qui restent assemblés en un complexe à la surface du mérozoïte (**Figure 6**) [48]. A la suite d'un deuxième clivage, le fragment de 42kDa donne une petite protéine terminale de 19kDa appelée MSP1-19 ou MSP1p19 qui reste fixée à la surface du mérozoïte par un ancrage *Pf*GPI [49]. Cette MSP1p19 accompagne le mérozoïte pendant la réinvasion et persiste jusqu'au stade trophozoïte chez l'hématie nouvellement infectée [42].

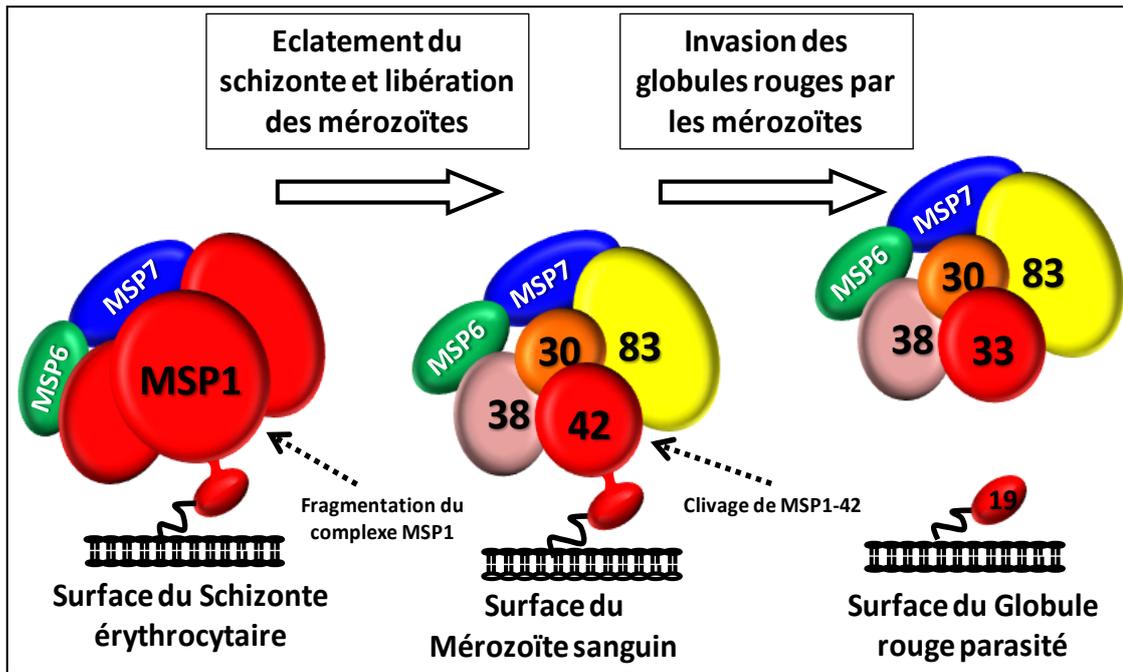


Figure 6: Formation des différents fragments de MSP1 au cours du cycle sanguin de *P. falciparum* [50].

III.2.2. Apical Membrane Antigen 1 (AMA-1 ou PfAMA1)

C'est une protéine membranaire localisée dans les micronèmes des régions apicales du mérozoïte qui contiennent des ligands pouvant s'associer à des récepteurs érythrocytaires. Encore appelée PfAMA₁ pour l'espèce *P. falciparum*. Elle est produite par les schizontes érythrocytaires matures [51]. Elle comporte une région ectoplasmique de 546 acides aminés, un segment transmembranaire composé de 21 amino-acides et un domaine cytoplasmique d'environ 55 acides aminés [52]. Lors de l'invasion de l'érythrocyte par le parasite, elle se répartit de façon homogène sur toute la surface externe du mérozoïte et elle subit une série de coupures protéolytiques. Initialement exprimée sous la forme d'un précurseur de 83 kDa (PfAMA₁₋₈₃), elle est dégradée en un polypeptide de 66 kDa PfAMA₁₋₆₆ [53] qui restera exposée à la surface du mérozoïte jusqu'à l'étape de la rupture des schizontes et durant toute la phase d'invasion du globule rouge [36]. La protéine se

subdivise en trois domaines (**Figure 7**): DI, DII et DIII sur la base des ponts disulfures [54] et de sa structure cristalline [55].

Elle jouerait un rôle lors de la réorientation du mérozoïte au cours de laquelle, les organites apicaux sont alignés sur la membrane des érythrocytes. Elle dispose d'enzyme protéolytique et joue un rôle clé dans l'adhérence [56]. Cette intervention dans le processus d'invasion érythrocytaire serait liée à la présence du domaine DIII [57]. *PfAMA₁* serait également impliqué dans l'invasion des hépatocytes [58]

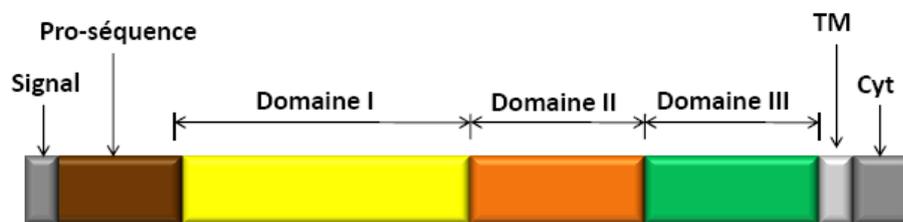


Figure 7: Représentation schématique d'AMA1 [57]

IV - PATHOLOGIE DE L'INFECTION PALUSTRE

Les manifestations cliniques du paludisme sont liées directement ou indirectement au cycle parasitaire notamment à la phase de schizogonie érythrocytaire. La gravité des symptômes dépend de l'espèce plasmodiale en cause, de la densité parasitaire et du degré de prémunition de l'hôte infecté. Deux principales formes cliniques sont observées dans l'infection par *P. falciparum*: l'accès palustre simple et les accès sévères ou accès pernicioeux.

IV.1. Accès palustre simple

La primo invasion apparaît chez un sujet non immun et le temps d'incubation est de 7 à 21 jours et parfois plusieurs mois pour *P.vivax* et *P.ovale*. Elle est cliniquement muette.

Lors de la phase d'état, la fièvre est la manifestation classique. Elle est observée au cours de l'étape sanguin du cycle parasitaire. Avec l'éclatement des schizontes intra-érythrocytaires, il y a une libération des mérozoïtes, d'un pigment plasmodial appelé hémozoïne et de différentes endotoxines aux propriétés pyrogènes comme la PfGPI. Ces substances sont à l'origine d'une inflammation et d'une fièvre [59]. La crise débute brutalement par des frissons intenses et des tremblements. La fièvre atteint 40 à 41°C dans le paludisme à *P. falciparum* et persiste généralement pendant 2 à 4h. Elle est suivie d'une hypersudation. Ces accès de frissons et de fièvre intermittents sont observés et ils peuvent devenir périodiques survenant toutes les 48h pour les infections dues à *P. falciparum*, *P. vivax* et *P. ovale* (fièvre tierce), tandis que pour celles causées par *P. malariae* l'intervalle entre les crises est de 72h (fièvre quarte). En dehors de la fièvre, on peut observer des céphalées, des douleurs articulaires, des myalgies, une anémie et même un ictère, accompagné souvent de nausées et de vomissements. Un accès dû à *P. falciparum* peut à tout moment se transformer en une forme grave surtout chez les enfants et les personnes non immunes [60].

IV.2. Formes graves du paludisme

IV.2.1. Définition et critères du paludisme sévère:

L'accès pernicieux palustre a été initialement défini par **Alphonse Laveran** comme une «forme suraiguë de paludisme à *P. falciparum* susceptible de tuer rapidement le malade en 36 à 72h lorsqu'un traitement spécifique n'est pas rapidement et correctement institué» [61]. Il touche essentiellement les sujets non immuns. Seule l'instauration rapide d'une prise en charge adaptée en réanimation peut alors permettre une survie du patient [62]. Le décès, quand il survient, est secondaire à la défaillance aiguë d'une ou plusieurs grandes fonctions, et ce parfois même si la mise en place d'un traitement étiologique s'avère efficace [14,63].

Tableau I: Critères cliniques de paludisme grave de l'OMS en 2000 [14]

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

Tableau II : Critères biologiques de paludisme grave de l'OMS en 2000 [14]

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

En 1990, l'OMS a défini le paludisme grave comme la présence de formes asexuées de *P. falciparum* dans le sang associée à un ou plusieurs critères dits majeurs [63]. Dans cette définition, des critères mineurs ne permettant pas à eux seuls de parler de paludisme sévère mais devant inciter à la vigilance, étaient également définis. En 2000, de nouveaux critères ont été édités par l'OMS [14] et ces critères sont de type cliniques ou biologiques, faisant ainsi disparaître la notion de critères mineurs (**Tableaux I et II**).

IV.2.2 Physiopathologie du paludisme sévère

Avec les critères de définition établis par l'OMS, les défaillances d'organes caractérisant le paludisme de réanimation ne se limitent pas au neuropaludisme et elles font intervenir à la fois le parasite et l'hôte [64]. Les progrès récents de l'immunologie, de la biologie moléculaire et de la génétique ont permis une meilleure approche physiopathologique des accès sévères et ont ouvert la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques [65].

IV.2.2.1. Aspects physiopathologiques liés au parasite:

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

❖ La cytoadhérence des GRp à l'endothélium vasculaire et aux cellules trophoblastiques placentaires est le mécanisme le plus rapporté ces dernières années [66]. Les GRp montrent des protubérances membranaires ou «knobs» renfermant des adhésines plasmodiales spécifiques comme la *PfEMP1* [33] qui permettent la fixation sur des ligands des cellules de l'endothélium capillaire ou placentaire, parmi lesquels CD36, l'ICAM-1, la VCAM-1 et la CSA. La *PfEMP1* est une molécule très variable. Elle est codée par un gène de la famille *var* [67]. Le génome parasitaire contient environ 50 à 100 copies de gènes *var*. Au niveau des

vaisseaux capillaires, la cytoadhérence des GRp entraîne des modifications de la transduction des signaux vers les cellules environnantes qui peuvent être à l'origine d'une apoptose des cellules endothéliales au cours du neuropaludisme (**Figure 8**) [68].

❖ Par l'intermédiaire de leurs protubérances, les GRp peuvent adhérer aux hématies non parasitées et former des amas appelés rosettes. La protéine *PfEMP1* de par son domaine DBL1 α serait impliquée dans ce phénomène de «rosetting» par une liaison aux récepteurs CR1 des érythrocytes. Ce phénomène a été bien étudié *in vitro* sur des lignées cellulaires et varie d'une souche plasmodiale à l'autre. Il demeure corrélé au degré de sévérité des accès [69].

❖ L'auto-agglutination des hématies parasitées a été observée sur de nombreuses souches de *P. falciparum* étudiées en culture *in vitro*. Les GRp se regroupent entre eux et forment des micro-agrégats susceptibles d'obstruer les capillaires profonds. Ce phénomène a été également observé chez des patients porteurs de fortes parasitémiés en dehors de tout phénotype d'adhésion. Les mécanismes moléculaires qui prédisposent à sa survenue sont encore inconnus. L'hypothèse mécanique est néanmoins insuffisante pour expliquer les lésions, en particulier cérébrales, du paludisme grave. En effet, la concentration cérébrale de récepteurs endothéliaux y est faible et le phénomène de cytoadhérence disparaît chez des singes splénectomisés [70].

V.2.2.2. Aspects physiopathologiques liés à l'hôte: phénomènes inflammatoires

La présence d'un agent infectieux dans l'organisme humain peut entraîner une réaction inflammatoire non spécifique qui limite les conséquences de l'infection avant que les phénomènes immunitaires ne neutralisent totalement le pathogène. Quand cette réaction inflammatoire devient excessive et inadaptée, elle est responsable de dysfonctions puis de défaillances d'organes caractéristiques du sepsis grave pouvant conduire au décès, malgré la disparition de l'agent infectieux [71].

Dans le paludisme à *P. falciparum*, des antigènes plasmodiaux comme RESA et d'autres facteurs parasitaires comme le PfGPI (glycolipide faisant partie des toxines parasitaires) facilitent le recrutement de macrophages et la libération par ces cellules de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 etc. (**Figure 8**) [66]. Le TNF- α est un acteur important, qui injecté aux souris reproduit la plupart des manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave de l'homme [72,73]. Il a été démontré que les taux élevés de TNF- α étaient corrélés au degré de sévérité du paludisme humain, à la parasitémie et à la mortalité [72,74]. Cette cytokine induit également la surexpression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales ce qui facilite le phénomène de cytoadhérence précédemment décrit [75].

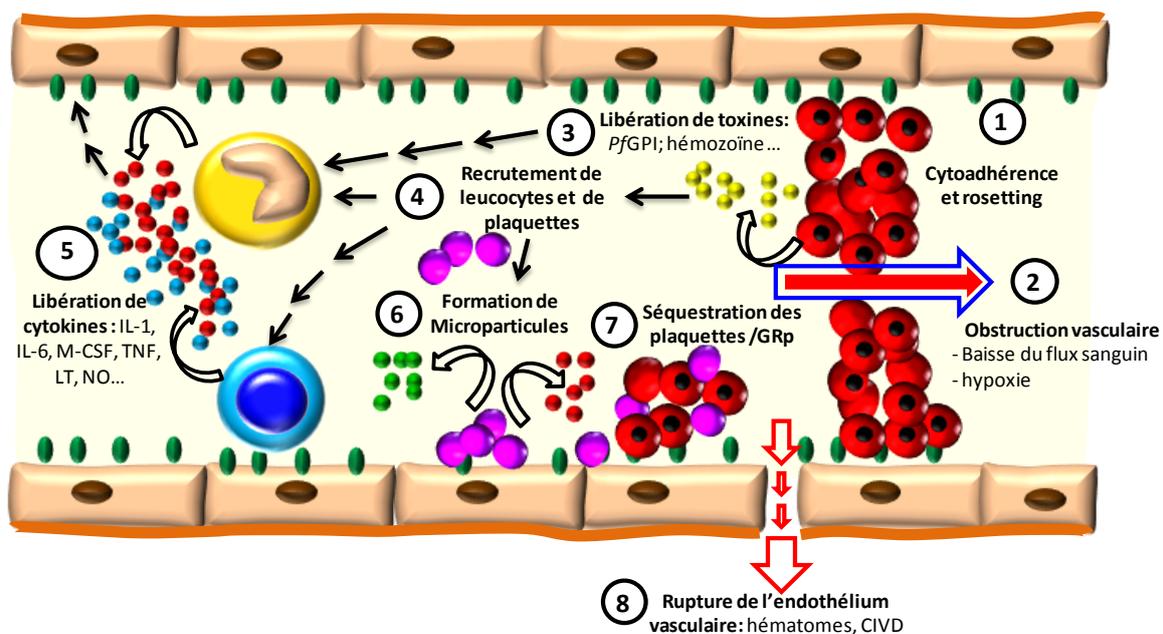


Figure 8: Physiopathologie du paludisme grave [4]

Le TNF exerce aussi une action antiparasitaire directe sur les stades érythrocytaires [76]. En association avec l'IFN- γ , elle favorise l'expression de la NO synthase par les monocytes et la production endothéliale de NO dont le rôle dans la physiopathologie du neuropaludisme est discuté [77]. *In vitro*, le NO produit par les hépatocytes activés par l'IFN- γ , induit l'élimination des parasites [77,78].

IV.2.3. Manifestations cliniques et biologiques du paludisme grave :

En zone de forte endémicité palustre, les accès graves sont plus fréquents chez l'enfant de moins de 5 ans et le sujet non-immun. En zone hypoendémique, toutes les classes d'âge sont concernées. Il existe une variabilité clinique suivant l'âge des malades. Le paludisme sévère nécessite une hospitalisation avec une prise en charge rapide en milieu de réanimation.

IV.2.3.1. Atteinte neurologique ou neuropaludisme

C'est la forme sévère prédominante. Elle est encore appelée neuropaludisme ou paludisme cérébral. Il peut s'agir d'une simple obnubilation, de somnolence ou de confusion; mais aussi de manifestations plus graves comme le coma ou les convulsions chez l'enfant. Néanmoins, lorsque l'infection est contrôlée, la récupération neurologique est souvent complète, notamment chez l'adulte ou les séquelles sont plus rares que chez l'enfant (**Figure 9**). L'œdème cérébral est rare chez l'adulte, mais peut être fulgurant et entraîner rapidement le décès. Le scanner ou l'imagerie par résonance nucléaire montrent souvent une augmentation modérée du volume cérébral qui serait liée à la séquestration des formes parasitaires dans les vaisseaux cérébraux [79].

Toutefois, la survenue brutale d'un coma sous traitement par la quinine doit faire immédiatement éliminer une hypoglycémie, néanmoins un coma peut survenir brutalement en dehors de toute hypoglycémie [80].

IV.2.3.2 Défaillance cardiovasculaire

Souvent associée à une défaillance multi-viscérale, elle est de mauvais pronostic [14,81]. L'atteinte myocardique est rare, cela malgré la séquestration parasitaire décrite au sein des vaisseaux cardiaques et la cardiotoxicité potentielle de plusieurs antipaludiques. Cette défaillance est considérée comme une résultante

d'un choc septique dans lequel pourraient contribuer les co-infections bactériennes. *P. falciparum* peut aussi en être le seul responsable [14].

IV.2.3.3. Acidose métabolique

C'est une acidose lactique. Plusieurs phénomènes s'intriquent pour l'expliquer: une glycolyse anaérobie, une diminution du transport en oxygène liée à l'anémie, une dysfonction mitochondriale, les convulsions prolongées, un choc septique d'origine parasitaire et/ou bactérien, une altération des mécanismes d'oxydo-réduction ou une diminution de la clairance hépatique du lactate [82]. Elle peut aussi être liée à l'insuffisance rénale aiguë notamment en cas d'anurie. L'acidose métabolique et le taux du lactate semblent avoir une bonne valeur pronostique tant en zone d'endémie que lors du paludisme grave d'importation [14,83].

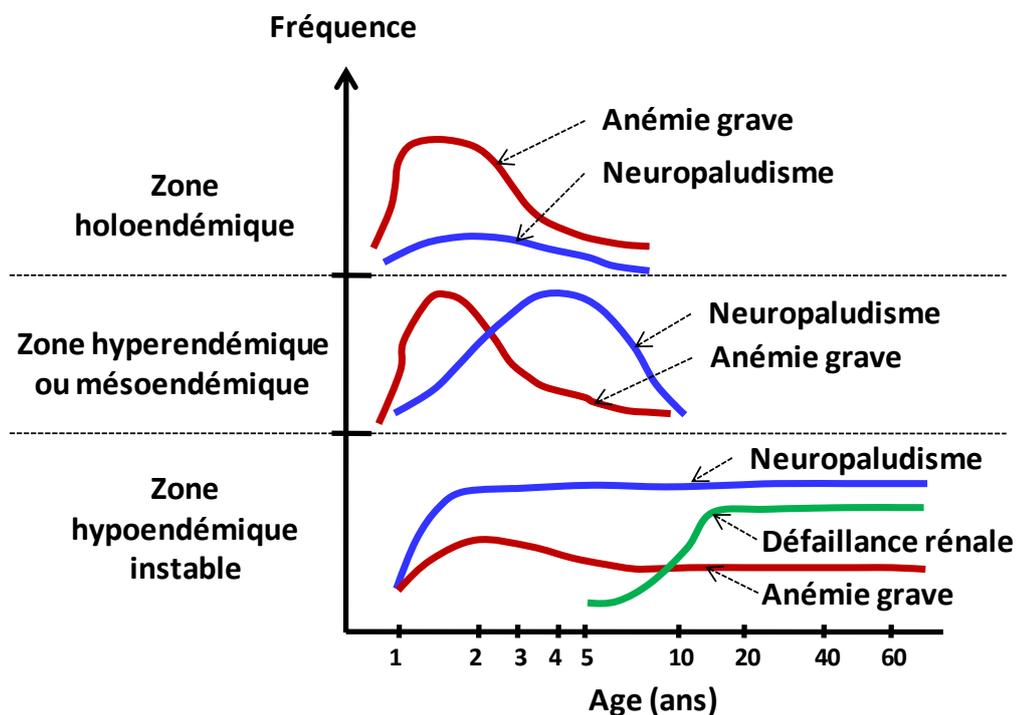


Figure 9: Variations des formes cliniques du paludisme grave suivant l'endémicité palustre et l'âge des patients

IV.2.3.4. Atteinte rénale

Définie par une diurèse < 12 ml/kg/24h ou par une créatininémie restant élevée par rapport à l'âge malgré la réhydratation initiale, elle est rare chez l'enfant (Figure 9) [84,85,86]. Cette atteinte est réversible en 2 à 3 semaines. Une protéinurie est fréquemment constatée chez les patients atteints et résulterait le plus souvent d'une néphrite tubulo-interstitielle aiguë, comme en témoignent les anomalies à la biopsie rénale [87]. L'atteinte peut aussi être liée à une ischémie rénale par cytoadhérence des GRp dans les capillaires glomérulaires [88]. Dans un modèle murin, le rôle des cytokines sur le tubule rénal et sur l'interstitium est également démontré. Par ailleurs, d'autres facteurs sont encore susceptibles d'intervenir à un moindre degré comme une hémolyse massive, une rhabdomyolyse. Une néphropathie glomérulaire immunologique est enfin rapportée, mais son rôle paraît anecdotique [88]

Chez l'enfant, l'évolution est en effet le plus souvent favorable spontanément et sans séquelles [86].

IV.2.3.5. Atteintes hématologiques

La thrombopénie est fréquente et souvent profonde. Sa valeur pronostique est faible et ses mécanismes physiopathologiques nombreux: une lyse intravasculaire, une diminution de la durée de vie des plaquettes, une splénomégalie, une séquestration vasculaire des plaquettes au contact des GRp. Au plan biologique, la coagulation est activée mais la CIVD est rare. Les hémorragies sont les conséquences mais elles sont moins fréquentes que ne le laisserait penser la profondeur de la thrombopénie [14].

A la différence du paludisme grave de l'enfant, l'anémie sévère palustre est rarement observée chez l'adulte (**Figure 9**). Définie par un taux d'hémoglobine inférieur à 8 à 9 g/dL en présence du parasite (Tableau II), elle est la forme la plus étudiée après le neuropaludisme. Lorsque le taux d'hémoglobine est inférieur à 6 g/dL, il est recommandé de rechercher une hémorragie non extériorisée comme la rupture de rate ou une fièvre bileuse hémoglobinurique [81].

IV.2.3.6. Hyper parasitémie

La relation entre la parasitémie et la gravité dépend du statut immunitaire des individus, celui-ci étant fonction de l'âge et du niveau d'exposition à l'infection. En zone holo-endémique, une charge parasitaire élevée est souvent mieux tolérée chez l'enfant que chez l'adulte, vraisemblablement du fait d'une meilleure immunité antitoxique [89]. Chez les enfants non immuns vivant en zone de paludisme instable, une parasitémie à 4 % représente un critère de gravité à part entière. En zone de transmission holo ou hyperendémique, une densité parasitaire \geq à 20 % est requise pour indiquer un accès palustre sévère [14].

IV.2.3.7. Atteinte hépatique

Elle constitue un réel problème dans la prise en charge des cas graves en réanimation. L'ictère est quasi-constant chez l'adulte ; en règle générale modéré et peut se limiter à un simple subictère conjonctival [14]. Il s'agit d'un ictère mixte, par hémolyse mais aussi par altération des fonctions de conjugaison hépatique et d'élimination biliaire [90].

L'hyperbilirubinémie est classiquement non conjuguée, liée à l'intensité de l'hémolyse. Cependant, elle peut être conjuguée témoignant, soit d'une cholestase liée à une ischémie (cytoadhérence et à la production de TNF- α), soit plus rarement d'une micro-angiopathie dans le cadre d'une coagulopathie de consommation. Souvent une cytolyse modérée est observée et elle peut exceptionnellement évoluer vers l'insuffisance hépato-cellulaire [14,91,92,93].

IV.2.3.8. Hypoglycémie

L'hypoglycémie profonde est surtout observée chez l'enfant. Elle est de mauvais pronostic et se définit par un taux sanguin de glucose $< 2,2$ mmol/L (< 400 mg/dL) [14]. Elle doit être systématiquement recherchée en cas de troubles de la conscience ou de convulsions. Elle relève de plusieurs mécanismes comme une augmentation de la consommation de glucose par le parasite et surtout par l'hôte,

une inhibition de la néoglucogenèse sous l'effet du TNF- α et une baisse des réserves de glycogène [61,94,95,96]. L'hyperinsulinisme induit par la quinine, décrit surtout chez la femme enceinte, aurait rarement une traduction clinique chez l'enfant, même en présence d'une malnutrition [97].

V - IMMUNITE ANTI-PALUSTRE

L'infection palustre engendre des réponses immunitaires chez l'hôte une composante innée ou non spécifique et une composante acquise ou spécifique qui agissent de façon complémentaire. L'immunité innée est activée dès le début de l'infection et oriente le développement de l'immunité « acquise ». L'immunité acquise est spécifique des stades de développement du parasite et des espèces parasitaires. Elle n'est que partiellement protectrice chez les sujets vivant en zone de forte endémicité.

V.1. Notion de prémunition

Une des caractéristiques de la relation «*homme/parasite/vecteur*» est l'acquisition, par les populations humaines exposées, d'une immunité anti-palustre progressive, éphémère et incomplète, dite «de prémunition» [98]. C'est un état d'immunité relative traduisant un équilibre hôte-parasite après plusieurs années d'exposition si la transmission est constante et relativement élevée. Elle protège d'abord contre la mortalité et les formes graves palustres, puis contre les accès palustres simples en diminuant leur incidence plutôt que leur gravité et enfin en réduisant la durée ou le niveau des infections par les stades sanguins. Cet équilibre est labile et disparaît en 12 à 24 mois chez le sujet immun qui quitte la zone d'endémie [99,100]. Le développement de cette immunité de prémunition est dépendant du contexte épidémiologique, de la saisonnalité et de l'intensité de transmission au niveau de la zone géographique. Elle apparaît d'autant plus rapidement que la transmission est importante et permanente. Mais le

développement de la prémunition n'empêche pas le portage de parasites faisant des sujets semi-immuns d'excellents "réservoirs" de parasites.

Dans certaines régions sèches, de paludisme instable, la transmission fluctue considérablement d'une saison et d'une année à l'autre, cela retardant l'acquisition de l'immunité [27].

V.2 La réponse immunitaire innée

Elle est activée dès le début de l'infection et repose sur l'intervention de plusieurs cellules parmi lesquelles les granulocytes, les monocytes macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes NK et les lymphocytes T $\gamma\delta$.

Les granulocytes comme les neutrophiles peuvent phagocyter les formes parasitaires avec la participation d'opsonines telles que des protéines du complément, la CRP et des anticorps [101]. Ces cellules produisent également des cytokines comme le TNF- α , IFN- γ , GM-CSF et IL1- β qui amplifient la phagocytose des mérozoïtes [102]. Il a été démontré que les neutrophiles peuvent inhiber la multiplication du parasite en produisant ces cytokines [103].

Les cellules NK ont également la capacité de produire certaines cytokines comme celles précédemment décrites en réponse à différents stimulus [104]. Leur sécrétion d'IL-8 en réponse à une stimulation *in vitro* par un extrait de GRp a été rapportée et la présence du parasite permet l'activation de leurs fonctions cytotoxiques et une surexpression de marqueurs d'activation comme CD69 à leur surface [105,106].

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes [107]. Elles sont activées via des récepteurs appelés PRR comme le TLR9 et produisent de l'IFN- γ en réponse à une stimulation par des lysats de GRp. Comme les cellules dendritiques, les monocytes/macrophage sont des cellules présentatrices d'antigènes, ils sont activés par la présence de *Plasmodium* et produisent aussi des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α . Ce sont des cellules phagocytaires et leur implication dans la clairance parasitaire a été largement rapportée. Leur

récepteur CD36 semble important dans la phagocytose des érythrocytes infectés et des mérozoïtes libres [108]. Aussi, le rôle majeur des monocytes /macrophages dans la production d'IFN- γ par les cellules NK a été démontré. Il passe par une production d'IL-18 par ces macrophages [109].

Les cellules T $\gamma\delta$ sont capables de reconnaître des molécules produites par *P. falciparum*. Ces cellules sont activées par des phospho-antigènes non peptidiques du parasite. Elles sont capables de produire de l'IFN γ , ce sont des cellules cytotoxiques pour les GRp [110].

V.3. Réponse immunitaire acquise

Elle repose sur l'intervention des lymphocytes T et B qui sont spécifiquement dirigés contre le parasite. Cette réponse immunitaire adaptative se divise en deux composantes essentielles l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale.

L'immunité à médiation cellulaire a été mise en évidence à la suite d'un transfert adoptif de ses cellules en absence de réponse humorale détectable. Elle est surtout l'œuvre des cellules TCD4⁺ et TCD8⁺ spécifiques au parasite et protégerait l'hôte contre les stades hépatocytaires et érythrocytaires car les parasites y sont intracellulaires et difficilement accessibles par les anticorps. Les lymphocytes TCD4 sont classés en plusieurs sous groupes qui agissent différemment selon le type de cytokines produites. Les cellules Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et l'IL-2 intervenant dans la réponse cytotoxique alors que les Th2 produisent des cytokines anti-inflammatoires comme IL-4 et IL-13 qui régulent la réponse humorale [111]. Une forte prolifération cellulaire TCD4⁺ et TCD8⁺ liée à une réponse cytokinique Th1 (IFN- γ et IL2) a été retrouvée associée à la protection contre le paludisme, indépendamment de la production d'anticorps [112,113].

La réponse humorale repose surtout sur l'intervention des cellules B qui après stimulation antigénique puis différenciation en plasmocytes, produisent les Ac. Le rôle des anticorps dans l'immunité anti palustre, bien étudié, est démontré.

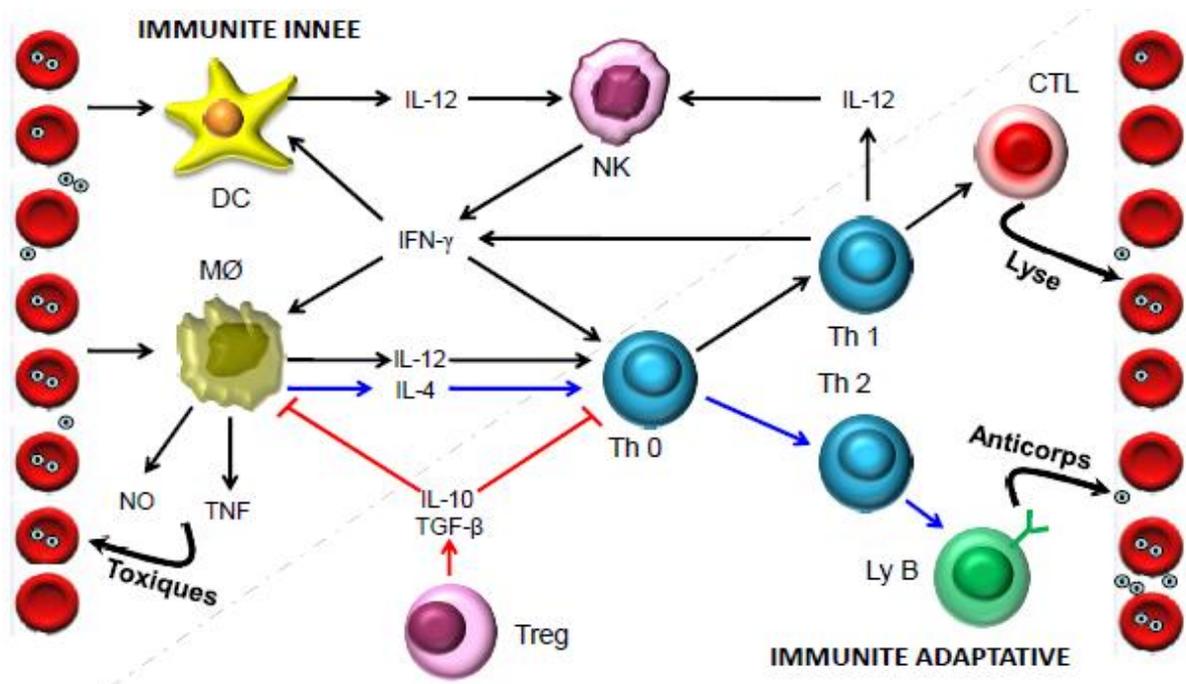


Figure 10 : Rôle des cellules effectrices et des cytokines dans l'immunité contre les stades sanguins de *P. falciparum* [114]

Les Ac peuvent bloquer l'invasion des hépatocytes. En effet, les fragments Fab d'Ac monoclonaux spécifiques des séquences répétées de la CSP inhibent l'infectivité des sporozoïtes *in vivo* et *in vitro*. Les Ac protecteurs sont principalement de type IgG₁ et IgG₃. Ils peuvent activer le complément et induire une lyse des sporozoïtes libres dans le sang. Les IgG₁ et IgG₃ spécifiques peuvent se fixer sur leurs récepteurs présents à la surface de cellules comme les neutrophiles et monocyte-macrophages pour entraîner la lyse des sporozoïtes par ADCI ou par phagocytose [115]. Les IgG₂ et IgG₄ seraient non protecteurs et des études ont montré qu'il existe une relation entre les taux d'IgG non cytophiles et la gravité de la maladie [116]. Les sporozoïtes de *P. falciparum* et de *P. vivax* semblent activer le complément par la voie classique via des complexes immuns.

Les Ac spécifiques des protéines de surface des gamétocytes de *P. falciparum* ingérés par le moustique peuvent empêcher la fertilisation des gamètes et le développement de l'oocyste [117,118].

VI. HYPOTHESE ET STRATEGIE D'APPROCHE DU TRAVAIL

Les formes graves du paludisme constituent encore un problème majeur de santé malgré la diminution de la morbidité et de la mortalité, liée surtout aux moyens de lutte utilisés. Avec une mortalité de 15 à 20%, l'accès grave résulterait d'une cascade complexe d'événements incluant probablement un défaut quantitatif et/ou qualitatif des réponses en Ac que l'on peut qualifier de « protecteurs ». Pour répondre aux nombreuses questions relatives à l'immuno-pathogénèse des accès cliniques, dans le cadre d'une approche analytique du paludisme hospitalier et de sa composante de gravité en termes de paludisme de réanimation, il est nécessaire de se focaliser sur un certain nombre de cibles d'intérêt de *P. falciparum*. Le mérozoïte constitue une cible privilégiée de l'immunité anti-stades sanguins et de nombreux candidats vaccins y sont associés comme les MSP. Notre étude a pour objectif d'amener un certain nombre de données sur les déterminants immunologiques impliqués dans la pathogénèse des manifestations graves du paludisme. Une des questions de base est : dans le cadre du paludisme de réanimation confirmé est ce que la létalité peut être rapprochée d'une réponse en IgG déficiente contre les protéines MSP1p19 et AMA-1. Cette analyse est basée sur l'hypothèse que le recrutement de malades hospitalisés, malgré son hétérogénéité individuelle, est relativement bien cadré dans la mesure où tous les individus ont les mêmes chances de se rétablir du fait d'un suivi médico-clinique dans un même service de réanimation de haute qualité. Une issue fatale peut-être considérée comme liée plutôt au malade et donc à son état immuno-parasitologique à l'entrée car tout aura été mis en œuvre pour permettre un rétablissement du patient.

Deuxième partie :

ETUDE EXPERIMENTALE

I. CADRE D'ETUDE

I.1. Caractères géo-climatiques

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

Son climat est caractérisé par une longue saison sèche qui s'étale entre Octobre - Juin et une saison pluvieuse de Juillet à Septembre. La température moyenne y varie entre 20 et 30°C. La végétation naturelle a pratiquement disparu de la ville qui n'abrite ni cours d'eau ni collections d'eau naturelles permanentes en dehors des bassins de rétention de l'eau des pluies. A la périphérie, sur des terrains non aménagés, il existe des puits appelés "céanes " et des collections dans la zone dite des Niayes qui s'étend même en dehors de la région de Dakar (Mboro: région de Thiès). Ces points d'eau constituent des gîtes larvaires potentiels pour les anophèles [24].

I.2. Endémicité palustre

La transmission du paludisme débute en Août et se prolonge jusqu'en Décembre, surtout du fait de l'existence de collections d'eau permanentes. Le niveau de transmission reste cependant très faible, au maximum une piqûre infestante par personne et par an en bordure immédiate des marais [20]. La population vectorielle est constituée d'anophèles du complexe *A. gambiae s.l.* et surtout de l'espèce *A. arabiensis* qui y sévissent toute l'année [23]. Les Culicidés sont aussi rencontrés, comme dans d'autres centres urbains avec une large prédominance de *C. quinquefasciatus* [20].

La zone est considérée comme hypoendémique. L'indice plasmodique varie entre 2 et 7%, selon les saisons et les quartiers [31] et le paludisme serait responsable d'environ 12,4% de l'ensemble de la pathologie fébrile [28]. La résistance aux antipaludiques, notamment à la chloroquine est aussi notée et a été l'objet de plusieurs études ; dont certaines ont rapporté plus de 40% de résistance [31]

I.3. Population d'étude

Les prélèvements étudiés ont été réalisés entre les mois d'Août et d'Octobre en 2003, en 2004 et en 2005. De Novembre 2012 à Janvier 2013, de nouveaux échantillons ont été collectés.

Ces recrutements ont eu lieu à l'HPD pendant les périodes de fortes incidences d'accès palustre, sur la base des critères de définition élaborés par l'OMS en 2000 et qui concernent les différentes formes cliniques du paludisme. Ce recrutement a reposé sur une étroite collaboration entre les chercheurs de l'IPD, les cliniciens et les laboratoires d'analyses médicales de la même structure hospitalière.

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

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

II - MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel de laboratoire

- Hotte à flux laminaire vertical.....(Flufrance[®], France)
- Plaques Maxisorp(Nunc[®] Danemark)
- Plaques Immulon.....(Dynatech, Roskilde[®] Danemark)
- Pipettes: 20, 200, 1000µl.....(Gilson Medical Electronics[®] S.A., France)
- Pipettes Falcon 5ml, 10ml(Becton Dickinson S.A, USA)
- Pipettes multicanaux de 12 à volume ajustable...(Costar[®] Cambribge, USA)
- Bac de dilution..... (Mega[®])
- Autoclave(Lequeur[®])
- Balance de précision(Navigator[®])
- Spectrophotomètre(Biorad[®])
- Centrifugeuse(Jouan[®] GR412)
- Etuves à 37°C(Napco[®] 6001)
- Microscope optique.....(Leica[®] DMBL)
- Congélateur à -20°C(Goldstar[®])
- Réfrigérateur à -4°C(White-Westinghouse[®])
- Tubes avec EDTA(Becton Dickinson S.A, Vacutainer)
- Tubes d'échantillonnage 1,8ml(Nunc[®] Danemark)
- Tubes coniques Falcon 15 ; 50 ml(Becton Dickinson S.A.)

II.1.2. Tampons et réactifs chimiques

- Tampon de "coating": PBS1X

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

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

H₂O distillée.....1000 ml

PBS pastille.....10 pastilles

- Tween 20 (Merck®).....1 ml
- Tampon de saturation et de dilution des sérums et conjugués: PBS BSA 1%
- Tween 1% de pour un litre
- H₂O distillée.....100 ml
- PBS pastille.....1 pastille
- BSA (Sigma®).....1 g
- Tween 20.....100ml
- Réactif de révélation:
- TMB (3,3',5,5' Tétraméthylbenzidine + H₂O₂) (Eurobio®)
- TMB peroxidase substrate et Peroxidase substrate solution B
- Les deux solutions A et B sont mélangées extemporanément à volume égale
- Solution d'arrêt:
- Pour un volume final de 580 ml :
- Acide ortho-phosphorique H₃PO₄ (Sigma®).....20 ml
- H₂O distillée.....560ml
- Anticorps conjugués:
- Anti-human IgG peroxydase conjugate (Cappel®, USA), utilisés à 1/4000
- Anti-human IgM peroxydase conjugate (Cappel®, USA), utilisés à 1/5000

II-1-3 Matériel biologique:

II.1.3.1. Sérums témoins systématiques:

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

❖ Les sérums contrôles négatifs sont au nombre de deux:

- Le témoin **NA** ou « Naïf Africain » élaboré à partir de sérums d'individus vivant à Dakar et n'ayant pas une expérience récente ou ancienne d'accès clinique, connue.

- Le contrôle **SAB** ou pool Sérum Humain AB

Ce sont généralement des hommes.

❖ **Les sérums contrôles positifs** sont également de deux types:

- Le témoin **SHI** ou Sérum Hyper-immun, constitués de plasmas prélevés au cours d'enquêtes immuno-épidémiologiques transversales, entreprises chez les populations des villages endémiques de Ndiop et de Dielmo. Ces villages sont situés à environ 280 Km au Sud-Est de Dakar et la transmission palustre y est pérenne avec environ 4,6 à 79 piqûres infectantes par personne et par an respectivement Ndiop et Dielmo. Les individus prélevés ont développé une très forte prémunité [17]

- Le témoin positif **MH** ou Sérum « Marcel Hommel », il s'agit d'IgG extraites d'un très grand pool de sérums recueillis chez des individus africains prémunis vivant en zone de forte endémicité palustre. Sa concentration en anticorps totaux est estimée à 20 mg/ml et on y retrouve des IgG dirigées contre tous les déterminants de *P. falciparum*.

II.1.3.2 Antigènes étudiés

Dans cette étude, deux types d'antigènes ont été utilisés: un antigène total ou somatique obtenu à partir d'une culture *in vitro* de *P. falciparum* et deux protéines recombinantes élaborées par génie génétique.

II.1.3.2.1. Extraits de mérozoïtes de *P. falciparum*

C'est extrait de mérozoïtes issu d'une culture *in vitro* de la souche de référence Palo Alto de *P. falciparum*. Cette souche est maintenue en culture au laboratoire à 37°C, dans une atmosphère saturée à 5% de CO₂. Le milieu de culture est constitué par RPMI 1640 (Sigma[®] Chemical Cie, St Louis, USA) supplémenté de L-glutamine et additionné d'albumax à 0,5% (Sigma[®] Chemical Cie, St Louis, USA) et d'antibiotique tel que la Gentamicine. La culture est faite en présence de globules rouges humains du groupe sanguin O⁺ provenant de donneurs indemnes de paludisme. C'est un milieu quotidiennement changé et sa parasitémie est évaluée en parallèle sur frottis. La technique d'isolement des mérozoïtes a été précédemment décrite par **Perraut et al.** [119]. En effet, à la suite d'une première

centrifugation de la culture à 1500 tr/mn pendant 5mn, les surnageants de culture avec une parasitémie supérieure à 5% sont collectés puis centrifugés à nouveau à 3000 tr/mn pendant 20 mn, afin d'obtenir un culot marron représentant les extraits mérozoïtaires. Ces derniers sont rapidement stockés à -20°C en attendant leur utilisation dans les tests ELISA.

II.1.3.2.2. Les protéines recombinantes

Elles sont toutes associées à la surface du mérozoïte sanguin. Ce sont les antigènes MSP-1p19 et AMA-1.

---- MSP1-19 ou MSP1p19

L'Ag MSP1 encore appelé p190 ou gp195 est la protéine majeure de la surface du mérozoïte. C'est une glycoprotéine abondamment exprimée à la surface du mérozoïte et produite au moment de la schizogonie érythrocytaire. Elle subit plusieurs coupures protéolytiques essentielles à l'invasion parasitaire. Ces étapes de protéolyse entraînent la formation de plusieurs fragments, dont un seul qui reste fixé à la surface du mérozoïte: MSP1p19 (**Figure 6**) [120]. C'est un candidat vaccin très avancé ayant fait l'objet de nombreuses études au sein de notre Unité à l'IPD. Les anticorps dirigés contre cette protéine sont protecteurs chez des modèles expérimentaux dont le modèle *Aotus* [121] et les résultats d'un essai vaccinal en phase 2b, ont montré que les sujets vaccinés produisent des Ac qui cependant n'ont pas beaucoup d'effets sur la sensibilité à la maladie [122]. L'antigène est actuellement utilisé dans des études précliniques et dans une autre phase 2b d'essais cliniques dans les vecteurs d'expression Adénovirus simien AdCh63 et la souche Ankara du virus de la vaccine (MVA): AdCh63/MVA-MSP1 [123].

Notre étude a porté sur ce fragment MSP1p19 et la protéine utilisée a été produite par génie génétique grâce au système d'expression baculovirus/cellules de papillon qui reproduit la conformation tridimensionnelle «EGF-like» de la protéine parasitaire. Ce système de production est développé par l'équipe de **Longacre S** à l'Institut Pasteur à Paris (33) et nous avons utilisé l'antigène à la concentration de 1µg/ml.

---- AMA1 ou PfAMA1

AMA1 de *P. falciparum* ou PfAMA1 est un antigène localisé dans les micronèmes du mérozoïte, ce qui suggère qu'il pourrait jouer un rôle dans le processus d'invasion [53]. Dans des modèles murins et primates, une réponse immunitaire protectrice induite par AMA-1 a été rapportée [124]. Différents essais vaccinaux de phase I ont été effectués chez l'homme avec des vaccins dérivés de cet Ag [125].

C'est une protéine produite avec le vecteur d'expression *Pichia pastoris* préalablement décrits par **Kennedy et al.** [124]. Nous avons utilisé l'Ag fusionné à la BSA au moment de sa purification. L'analyse des réponses Ac contre l'Ag que nous avons étudié (AMA-1/BSA) requiert donc un contrôle des réponses Ac individuelles dirigées contre la BSA. Ainsi, nous avons dosé les réponses en IgG dirigées contre la BSA qui ont été retranchées des amplitudes obtenues avec le complexe AMA-1/BSA au moment des calculs des ratios de DO. Le complexe AMA-1/BSA et la BSA ont été utilisés à la concentration de 1 µg/ml au moment de la sensibilisation des plaques pour l'ELISA.

II.2. Méthodologie

II.2.1. Technique de diagnostique

Différentes méthodes diagnostiques sont actuellement disponibles. L'examen microscopique d'un frottis sanguin et d'une goutte épaisse demeure la méthode de référence en termes de sensibilité et de spécificité. Il permet de confirmer la maladie, d'identifier l'espèce plasmodiale en cause et d'évaluer la parasitémie, ce qui conditionne à la fois le pronostic et la conduite thérapeutique.

II.2.1.1.Frottis sanguin

▪ Technique

La recherche des parasites s'effectue au microscope sur du sang étalé sur lames de verre (25 x 75 mm ; polies et dégraissées) et colore. Le prélèvement de sang est généralement calibre avec une pipette appliquée au bout du doigt (vaccinostyle sterile) ou a partir d'un prélèvement EDTA au pli du coude. Déposé sur une lame porte objet dégraissée, le sang est étalé en couche fine mono-érythrocytaire par un geste rapide et régulier a l'aide du petit bord mousse d'une autre lame (tenue a 45° de la lame portant la goutte de sang). Le frottis doit être séché et fixe 30 secondes au méthanol. La technique originelle de coloration du May Grunwald Giemsa (MGG) consiste a recouvrir le frottis d'une solution de May Grunwald et laisser agir 3 minutes. Laver ensuite rapidement a l'eau tamponnée. Recouvrir d'une solution de Giemsa diluée a 3 % dans du tampon phosphate a pH 7,2 et laisser agir 15 minutes. Laver a l'eau du robinet et sécher.

▪ Résultats

Le frottis mince (1-1,5 μL de sang étalé sur 250-600 mm^2) est la méthode de référence pour l'étude morphologique des hématozoaires et pour le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales. La lecture de 100 champs microscopiques (oculaires 5 a 7 x et objectif a immersion 100 x) représente 0,005-0,01 μL de sang.

Le FS permet en outre, de calculer la parasitémie ; La densité parasitaire est généralement estimée en pourcentage d'hématies parasitées/total des hématies examinées, ou parasites par microlitres .la densité parasitaire est très utilisé en cas d'infection à *P.falciparum*. Lorsqu'on observe une hyperparasitémie c'est-à-dire $\geq 4\%$ chez un sujet non immun, est un des indicateurs de la gravité de l'accès palustre [81]. Le seuil de détection du FS est de 100 parasites/ μl [126].

II.2.1.2 Goutte épaisse

▪ Technique

Le sang déposé sur une lame est étalé et défibriné avec le coin d'une autre lame par un mouvement circulaire pour former un disque d'environ 1 cm de diamètre. Laisser sécher, provoquer une hémolyse avant fixation et coloration par une solution de Giemsa à 3 % dans du tampon phosphate à pH 7,2 et laisser agir 15 minutes. Laver à l'eau du robinet et sécher. L'hémolyse à l'eau du protocole classique peut être avantageusement remplacée par la méthode récente de Thellier plus rapide (10 minutes) et de lecture facilitée.

▪ Résultats

La GE (2-3 μL de sang sur 50 à 90 mm^2) permet, pour un même champ microscopique, d'examiner rapidement un volume de sang plus important et un plus grand nombre de parasites soit une parasitémie plus faible de l'ordre de 10 à 20 parasites/ μl que sur un FS.

En revanche, la GE ne permet pas le diagnostic de certitude des espèces plasmodiales en raison de la lyse des hématies qui réduit les critères morphologiques d'identification. La GE classique. L'apparence des parasites peut être altérée à cause de la deshémoglobination et du séchage. Les jeunes trophozoïtes peuvent apparaître comme des anneaux incomplets ou des taches de cytoplasme bleu avec un point séparé rouge (chromatine).

Le cytoplasme des trophozoïtes âgés de *P. vivax* peut être fragmenté et les grains de Schuffner moins évidents. La forme en bande de *P. malariae* est souvent moins caractéristique. La distinction entre *P. vivax* et *P. ovale* peut être difficile

II.2.2. Technique ELISA

Le dosage des immunoglobulines dirigées contre les différents antigènes étudiés a été fait par la technique ELISA.

■ Principe:

C'est une technique mettant en jeu deux types de réactions d'une part l'Ag avec l'Ac et de l'autre une enzyme avec son substrat. L'Ag fixé sur un support solide (plaque de 96 puits) est lié de façon non covalente par l'Ac contenu dans le plasma. Cette liaison Ag-Ac est ensuite révélée par un système d'Ac couplé à une enzyme (conjugué) qui en présence de son substrat donne une coloration dont la densité optique est proportionnelle à la concentration d'Ac fixé.

■ Mode opératoire:

La méthode ELISA comporte différentes étapes représentées sur la figure 11. Pour chaque étape, il existe des conditions devant être respectées.

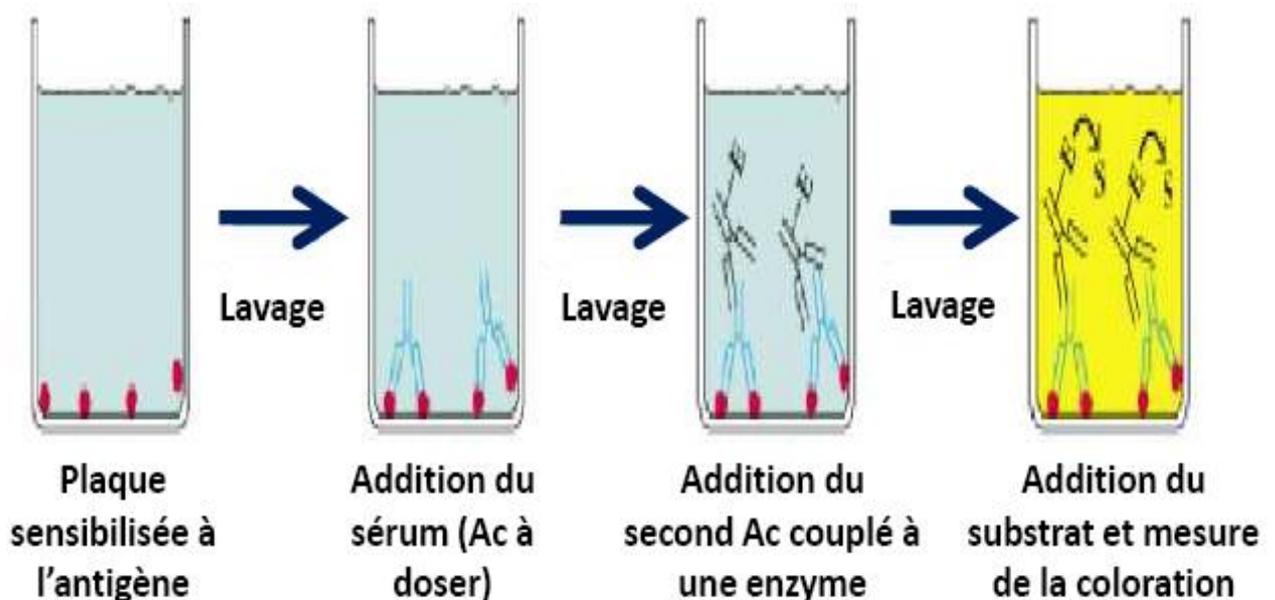


Figure 11: Principales étapes du dosage d'anticorps sériques par ELISA.

- Etape de Sensibilisation des puits de la plaque avec l'Ag ou « coating »:
Les plaques sont sensibilisées avec 100µl par puits d'Ag préalablement dilués dans du tampon de dilution. Ces plaques sont ensuite incubées à 4°C pendant une nuit. La dilution effectuée varie selon l'Ag et elle est déterminée à la suite d'un test de calibration.
- Etape de saturation des plaques:
 - Laver les plaques 3 fois avec le tampon de lavage et essorer en tapant contre un papier absorbant;
 - Distribuer 130 µl de la solution de blocage dans tous les puits;
 - Incuber pendant 1h, les plaques à 37°C.
- Etape d'addition du sérum:
 - Laver 3 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer;
 - Pendant la période d'incubation du blocage, diluer les sérums témoins positifs et négatifs et les plasmas de volontaires au 1/100 dans le tampon de dilution;
 - Distribuer 100 µl des sérums et plasmas dilués dans les puits conformément au schéma de plaque;
 - Incuber pendant 1h les plaques à 37°C.
- Etape d'addition du conjugué:
 - Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et essorer;
 - Distribuer dans les puits 100 µl du conjugué anti-IgG humaine de chèvre diluée à 1/5000 dans le tampon de dilution;
 - Incuber pendant 1h la plaque à la température du laboratoire dans une chambre humide en agitation lente.
- Etape de révélation:
 - Laver 4 fois les plaques avec le tampon de lavage et bien essorer.
 - Distribuer 100 µl de substrat de l'enzyme (TMB) dans chaque puits.
 - Incuber pendant 5 à 10 mn à l'abri de la lumière.

- Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl d'une solution acide ortho-phosphorique H₂SO₄ 1M dans chaque puits.
- Etape de lecture au spectrophotomètre et de calcul des ratios de DO:
 - Mesurer les DO des puits à l'aide d'un spectrophotomètre à 450 nm.
 - Calculer des ratios de DO à l'aide de feuilles Excel.

II.2.3. Analyses statistiques des résultats

Les données ont été analysées avec le logiciel STATVIEW[®] version 5.1. Les comparaisons des niveaux de réponses en anticorps entre les différents groupes ont été effectuées grâce aux tests non paramétriques de Mann Withney, de Wilcoxon ou de Kruskall Wallis. La recherche de corrélation a été faite par le test des rangs de Spearman. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative.

III: RESULTATS

III – 1- Caractéristiques de la population d'étude

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

Tableau III: Données générales de la population d'étude

Caractéristiques	Accès sévères			Accès simples
	Survivants	Décédés	Global	
Effectifs (N)	103	38	141	110
Sexe M/F	68/35	20/18	88/53	60/50
Age moyen (ans)	33,5 (11 – 80)	29,2 (1 – 77)	30,4 (8 – 80)	28,7 (1 – 77)
Délai d'admission ou de consultation (j)	4 (1 - 12)	6 (2 - 21)	5 (1 - 21)	3 (2 - 10)
Traitement antérieur (%)	71,5	57,9	67,8	49,3

Le tableau III résume les données générales de la population d'étude. Notre cohorte est composée de 110 personnes souffrant d'un accès palustre simple et de 141 patients hospitalisés pour un paludisme sévère parmi lesquels 38 patients sont décédés.

Le sex-ratio est en faveur des hommes dans les différents groupes de patients. Un âge moyen de 28 à 34 ans est observé et les délais d'admission c'est-à-dire le nombre de jour entre la première apparition des signes cliniques et la date d'hospitalisation ou de consultation, s'avère plus court dans les accès simples (3 jours). Dans le paludisme de réanimation, on note une moyenne de 5 jours. Toutefois, il est plus long chez les patients décédés d'un accès sévère (6 jours).

S'agissant du traitement antipaludique reçu par les patients avant leur recrutement, nous avons noté des proportions plus faibles dans le paludisme simple

avec une moyenne de 49,3%. Pour le paludisme de réanimation, 67,8% des patients ont été traités avant leur hospitalisation.

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

Elles sont résumées au niveau du tableau IV. L'analyse de ces données montre des variations statistiquement significatives pour la parasitémie et la glycémie. En effet, les patients hospitalisés pour paludisme grave ont des taux plus élevés pour ces deux paramètres.

Une comparaison des autres paramètres suivant la gravité permet de constater des taux de plaquettes et d'hématocrite sanguins plus forts chez les patients consultant pour un accès palustre non aggravé ($P < 0,05$).

Tableau IV: Caractéristiques clinico-biologiques de la population d'étude

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

Test de Mann-Whitney, ns = différence non significatif ($P > 0,05$)

Dans les cas de paludisme sévère, des différences significatives des taux de leucocytes sanguins, de la densité parasitaire et des bicarbonates, sont observées entre le groupe des patients décédés et celui des survivants. Ces paramètres biologiques sont plus élevés chez les patients décédés ($P < 0,05$). S'agissant des taux sanguin d'hémoglobine, du pH sanguin et du score de Glasgow utilisé pour

une appréciation de la profondeur du coma (**Annexe II**), ils sont plus faibles chez les malades n'ayant pas survécu aux accès sévères à *P. falciparum* (**Tableau IV**).

III - 2- Evolution des réponses anticorps contre les antigènes étudiés

III-2-1- Evolution des réponses Ac suivant la gravité des accès palustres

Ce sous chapitre regroupe les résultats des comparaisons des incidences et niveaux des réponses en IgM et IgG entre les patients atteints de paludisme simple et ceux hospitalisés pour accès grave.

III-2-1-1. Comparaison des prévalences de répondeurs

Le tableau V regroupe les prévalences des répondeurs considérés comme étant les individus montrant des ratios de DO ≥ 2 , à l'issue du dosage des Ac.

Tableau V: Prévalences de répondeurs dans les différents groupes

Caractéristiques	Accès sévères					Accès simples
	Survivants	<i>P</i> *	Décédés	Global	<i>P</i> *	
IgM anti-mérozoïtes	37%	<0,05	07%	29%	<i>ns</i>	36%
IgG anti-mérozoïtes	68%	<i>ns</i>	57%	65%	<i>ns</i>	51%
IgG anti-MSP1p19	89%	<i>ns</i>	76%	86%	<0,05	46%
IgG anti-AMA1	91%	<i>ns</i>	89%	90%	<i>ns</i>	91%

Test de Mann-Whitney, ns = différence non significatif ($P > 0,05$)

Cette présentation des prévalences spécifiées dans les différents groupes de patients montre pour les réponses en IgM dirigées contre l'extrait de mérozoïtes, de faibles pourcentages de répondeurs (<40%). Pour les réponses en IgG, les prévalences sont toutes supérieures à 40%.

Les antigènes MSP1-p19 et AMA-1 sont fortement reconnus avec des prévalences de réponses positives qui tournent autour de 80%. Cependant, seule la variation des pourcentages de répondeurs en IgG anti-MSP1p19 est discriminante

entre les patients souffrant du paludisme de réanimation (86%) et ceux présentant un accès palustre non aggravé (46%) (**Tableau V**).

III.2.1.2. Comparaison des niveaux de réponses anticorps

Les niveaux de réponses en IgM et IgG dirigées contre les différents Ag testés sont exprimés en ratio de DO et illustrés suivant la gravité de l'accès palustre au niveau des figures 12a et 12b. En moyenne, les amplitudes de réponses en IgG anti-mérozoïtes sont plus élevées dans le paludisme sévère que dans les accès palustres non aggravés ($P = 0,003$) (**Figure 12a**).

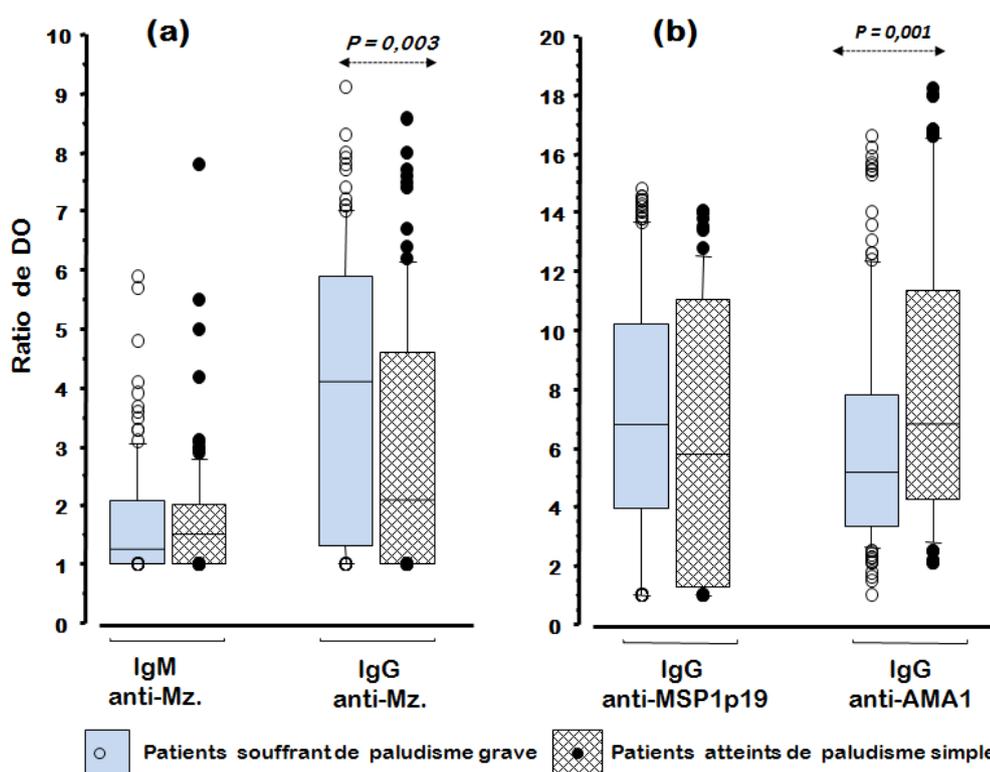


Figure 12: Comparaison suivant la gravité des accès palustres des niveaux réponses en IgM et IgG anti-mérozoïtes: (a) ou en IgG anti-MSP1p19 et anti-AMA-1 (b)

Concernant les taux d'IgG anti-MSP1p19, aucune variation importante n'est observée entre les deux types d'accès cliniques. Seule l'analyse des taux d'IgG dirigées contre l'Ag AMA-1 a permis de déceler une baisse significative des

niveaux de réponses chez les patients souffrant d'accès sévères comparés au groupe des malades avec accès simple ($P < 0,01$) (Figure 12b).

III.2.2. Evolution des réponses Ac suivant l'issue du paludisme sévère

Il s'agit d'une analyse comparative des prévalences de répondeurs et des niveaux de réponses Ac suivant l'issue du paludisme de réanimation.

Une première comparaison des pourcentages de répondeurs ($rtDO \geq 2$) suivant l'issue du paludisme grave a été précédemment résumée au niveau du **Tableau V**. Pour les IgM anti- mérozoïtes, les prévalences passent de 7% chez les décédés à 37% chez les survivants soit une multiplication par cinq du nombre de répondeurs ($P < 0,05$). Pour toutes les autres réponses Ac de type IgG aucune variation statistiquement significative n'a été notée quel que soit l'Ag considéré.

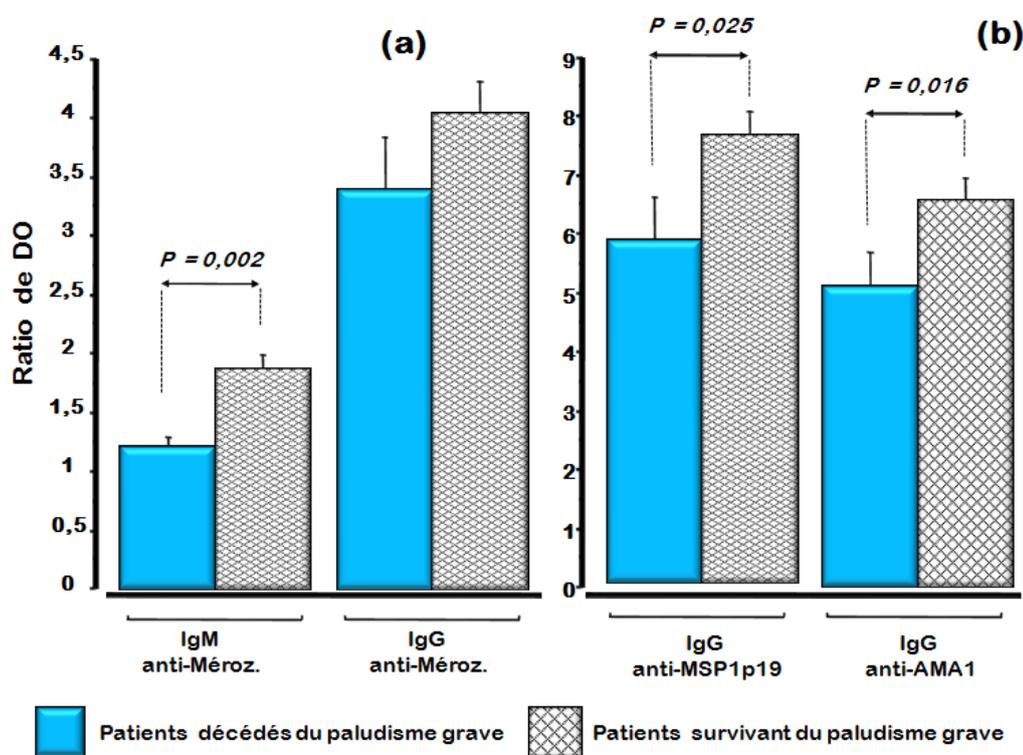


Figure 13 : Comparaison des niveaux réponses en IgM et IgG anti-mérozoïtes (a) ou en IgG anti-MSP1p19 et anti-AMA1 (b) suivant l'issue des accès graves

Toujours concernant les cas de paludisme de réanimation, les histogrammes des **Figures 13a et 13b** représentent une comparaison des taux de réponses Ac dirigées contre les mérozoïtes, la protéine MSP1p19 et l'Ag AMA-1. Les patients y sont séparés en décédés et survivants.

La **Figure 13a** permet de constater une hausse significative des taux d'IgM anti-mérozoïtes chez les survivants comparés au groupe des malades à issue fatale ($P = 0,002$). Pour le même Ag, on note l'absence de variations significatives des niveaux de réponse en IgG suivant l'issue de l'accès sévère.

Les amplitudes de réponse IgG anti-AMA1 et IgG anti-MSP1p19 sont plus élevées chez les patients ayant survécu au paludisme de réanimation avec des p-values respectivement égales à 0,016 et 0,025 (**Figure 13b**).

III-2-3-Variations des réponses Ac suivant les caractéristiques hématoparasitologiques des patients

En tenant compte de la gravité et de l'issue du paludisme, nous avons recherché l'existence de variations des niveaux d'Ac suivant l'âge des patients. Aucune différence de niveaux n'a été décelée dans les différentes formes de paludisme étudiées.

Afin de déceler un éventuel impact des niveaux de réponses Ac sur les données hématoparasitologiques et cliniques des patients, nous avons procédé à une analyse des caractéristiques des réponses immunologiques suivant des paramètres tels que la densité parasitaire, les taux d'hémoglobine et de plaquettes entre autres.

III.2.3.1. Comparaison des réponses Ac suivant les densités parasitaires

Sur la base du seuil parasitémiq ue de 4% considéré par l'OMS comme étant la limite au delà de laquelle, on parle de gravité de l'infection par *P falciparum* (**Tableau II**), nous avons réparti notre population d'étude particulièrement les cas de paludisme sévère, en deux groupes: (i) des patients

ayant une parasitémie inférieure à 4% et (ii) des patients avec une parasitémie \geq 4%.

La comparaison des réponses en IgG dirigées contre les Ag testés est illustrée par la **Figure 14a** pour les survivants et la **Figure 14b** pour les patients décédés. Le seul résultat montrant une tendance importante concerne l'Ag AMA-1 qui est plus fortement reconnu par les patients survivant ayant de densités parasitaires inférieures à 4%. Cette variation n'est pas cependant significative du point de vue statistique. Elle apparaît toutefois importante car n'étant pas observée dans les deux sous groupes définis chez les décédés. En effet, pour AMA-1, les malades décédés fortement parasités (parasitémie \geq 4%) montrent les réponses en IgG les plus élevées ($P = 0,034$).

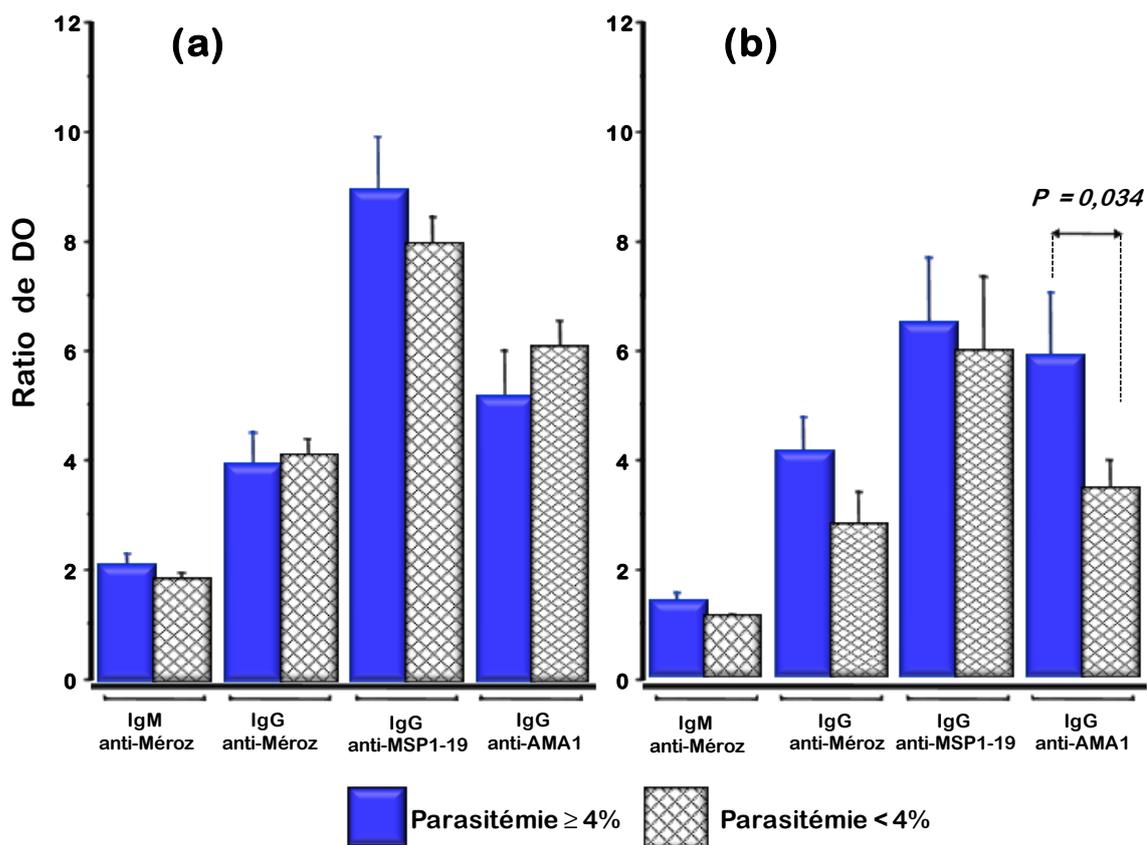


Figure 14: Variations des taux d'anticorps suivant la parasitémie dans le paludisme sévère: (a) patients survivant et (b) patients décédés

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

III.2.3.2. Comparaison des réponses Ac suivant le taux d'hémoglobine

Dans l'optique de rechercher des liaisons entre les réponses Ac et les défaillances hématologiques comme l'anémie, nous avons déterminé dans chaque groupe d'accès palustres, deux nouveaux sous-groupes de patients suivant le taux d'hémoglobine séparés au seuil de 11g/dl. Cette nouvelle dichotomisation des patients initialement séparés suivant la gravité de l'accès a permis la comparaison des réponses en IgM et IgG dirigées contre nos antigènes (**Figures 15a et 15b**).

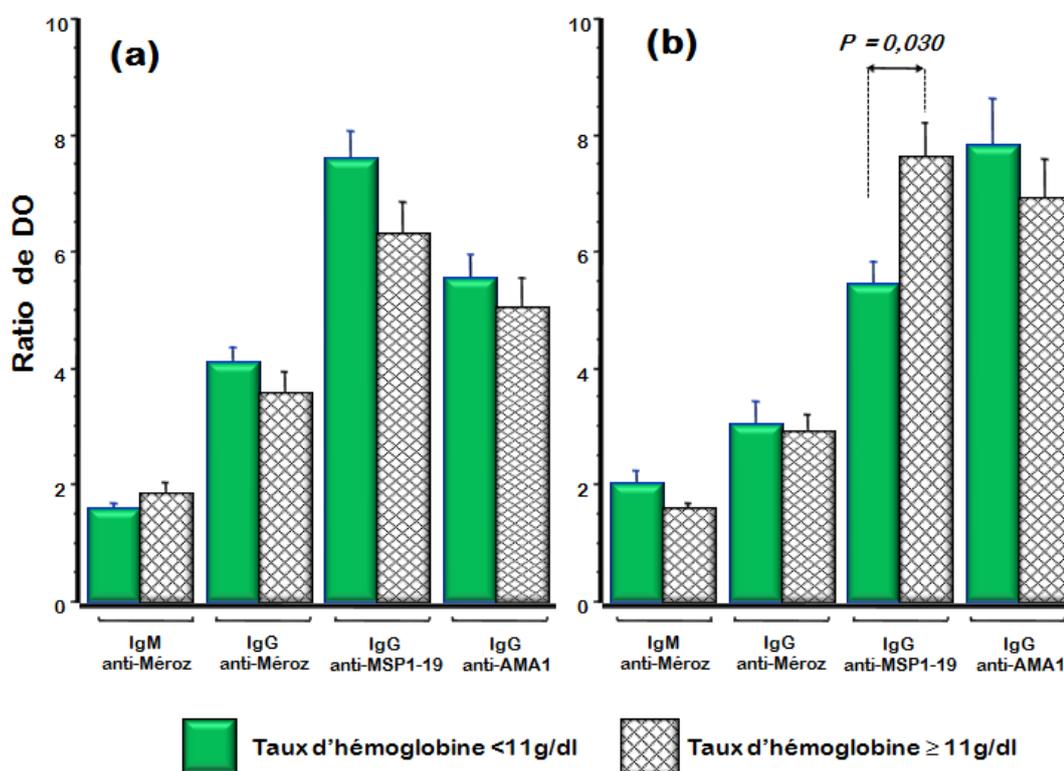


Figure 15: Variations des taux d'Ac suivant l'hémoglobinémie: (a) patients avec paludisme grave et (b) patients avec paludisme simple

Dans le groupe des patients hospitalisés pour un accès palustre compliqué, les niveaux de réponses en IgG semblent plus élevés chez malades ayant des taux

d'hémoglobine inférieurs à 11g/dL, ceci pour tous les Ag testés. Il convient de bien préciser qu'aucune de ces variations n'est statistiquement significative (**Figure 15a**). En outre, dans ces cas de paludisme sévère, une analyse plus poussée tenant compte du taux d'hémoglobine et comparant les réponses Ac entre les survivants et les décédés, n'a pas décelé de différence importante suivant l'issue des malades.

Chez les patients atteints de paludisme simple, seule la réponse en IgG anti-MSP1p19 apparait discriminante entre les deux sous-groupes définis suivant l'hémoglobininémie. En effet, les réponses en IgG anti-MSP1p19 sont plus fortes chez les consultants ayant les taux d'hémoglobine les plus élevés ($P = 0,03$) (**Figure 15b**).

III.2.4. Interrelations entre les réponses Ac dans les deux types d'accès

Pour évaluer la participation des taux d'IgG dirigées contre les deux protéines recombinantes dans la réponse globale contre la protéine somatique constituée par l'extrait de mérozoïtes, nous avons recherché des corrélations entre les diverses réponses en tenant compte de la gravité et de l'issue du paludisme hospitalier.

Concernant IgG anti-MSP1-19 et IgG anti-mérozoïtes, les figures 16a et 16b montrent les résultats obtenus sous forme de nuages de points bivariés.

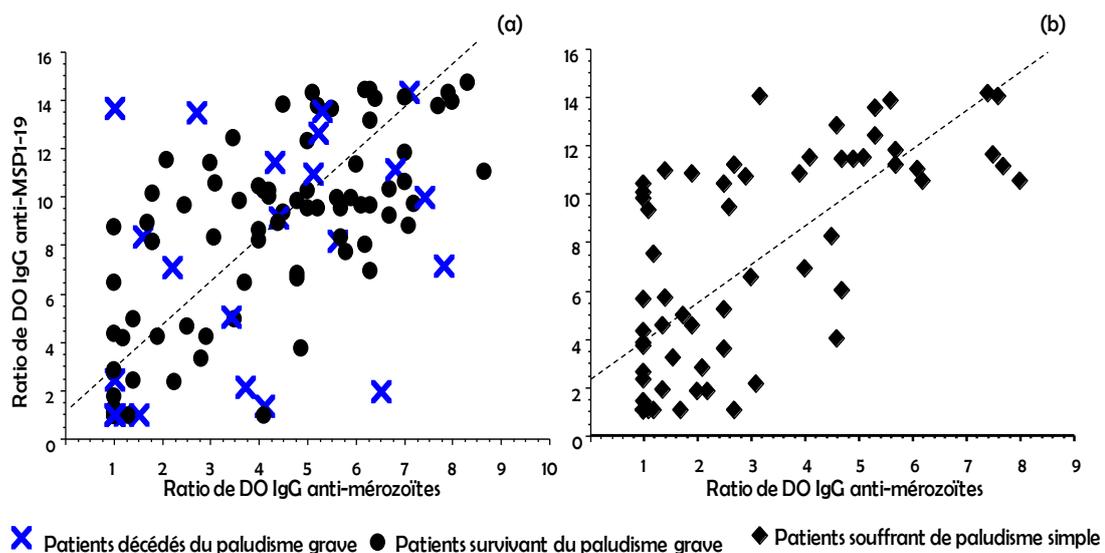


Figure 16: Corrélations entre les IgG anti-mérozoïtes et les IgG anti-MSP1p19

Il existe des corrélations positives entre ces réponses IgG chez les patients survivants des accès graves ($P = 0,03$, $Rho = 0,63$) (**Figure 16a**) et dans le paludisme simple ($P = 0,02$, $Rho = 0,71$) (**Figure 16b**). Des résultats similaires sont obtenus entre les taux d'IgG anti-AMA-1 et ceux des IgG anti-mérozoïtes. Toutefois, les coefficients de corrélations ($P < 0,05$, $Rho = 0,52$) sont plus faibles que celles obtenus pour la protéine MSP1p19. Aucune corrélation n'a été décelée chez les patients décédés du paludisme sévère.

IV - DISCUSSION

Ce travail a pour but d'évaluer la réponse Ac spécifiquement dirigée contre le mérozoïte et deux antigènes majeurs associés à sa surface: MSP1p19 et AMA-1 dans le paludisme de recrutement hospitalier en vue mettre en évidence des facteurs immunologiques en relation avec la gravité et l'issue des accès palustres. Cette approche a nécessité un recrutement parallèle de patients souffrant d'un paludisme non aggravé comme groupe témoin. Tous ces patients ont été recrutés à l'HPD. Il s'agit de malades hospitalisés dans le Service de soins intensifs pour les cas de paludisme grave ou suivis dans les autres Services de Médecine pour les accès palustres simples.

Notre discussion s'articulera d'abord sur les points méthodologiques, puis les caractéristiques clinico-biologiques discriminantes de la population d'étude et enfin sur les données relatives à l'évaluation des réponses Ac suivant la gravité et l'issue des accès.

■ Méthodologie

Sur le plan méthodologique, le choix de l'HPD s'explique d'abord par l'accessibilité géographique, l'existence d'une collaboration avec l'Unité d'Immunogénétique de l'IPD depuis 1991, mais aussi et surtout de la qualité de la prise en charge des patients souffrant du paludisme simple ou aggravé. En effet, la mise en place d'une étude comme celle que nous rapportons, nécessite d'une part une collaboration avec des cliniciens et biologistes expérimentés et d'autre part une définition claire des critères cliniques et biologiques des accès palustres. Nous avons choisi comme base de recrutement la définition du paludisme de réanimation élaborée par **Saissy et al.** [6] à partir des critères de gravité définis par l'OMS en 2000 [14]. Cette définition serait plus complète et aisément applicable par les réanimateurs avec lesquels nous avons entretenu une collaboration quotidienne pour parvenir au recrutement d'une population d'étude rigoureusement ciblée et représentative. En effet, la stratégie d'approche de ce travail a reposé sur une visite journalière des différentes unités hospitalières concernées et sur une

surveillance régulière des patients pouvant être transférés d'un service à l'autre. Nous avons procédé pendant cette période à l'enregistrement sur formulaire (**Annexe I**) des résultats des divers tests de diagnostic prescrits par les médecins traitant. En plus des données cliniques connus comme n'étant pas spécifiques du paludisme, la confirmation de l'infection par *P. falciparum* a reposé sur une recherche du parasite par frottis ou GE ou de ses antigènes au niveau sanguin par un test de diagnostic rapide.

Concernant la technique ELISA, les résultats obtenus restent comparables à l'ensemble des données antérieurement obtenus avec les mêmes Ag. Une très bonne reproductibilité des résultats a pu être établie grâce à l'utilisation constante des mêmes contrôles positifs et négatifs. Ce constat est un élément fondamental pour la validité de l'analyse des réponses Ac [127].

Une simple mesure de DO est insuffisante pour valider un taux d'Ac chez un individu à un moment donné. C'est ainsi que le calcul des résultats sous forme de ratio de DO est un outil analytique pour pouvoir mener des comparaisons entre différentes séries de mesures et entre les divers groupes. Cette expression des résultats repose sur les données précédemment rapportées par notre Unité [119,127,128]. Aussi avec cette approche, nous avons pu valider également l'utilisation de l'Ag AMA-1 sur la base de ratio de DO retranché des bruits de fond reliés la protéine BSA. Pour la BSA, les bruits de fond sont faibles (DO moyenne = 0,07) ce qui est un argument fort pour la validité d'utilisation de peptides conjugués comme biomarqueurs.

■ **Caractères clinico-biologiques**

S'agissant de l'analyse des caractéristiques clinico-biologiques des patients étudiés, nous avons retrouvé des variations significatives de la parasitémie suivant la gravité. En effet, les densités parasitaires observées sont plus élevées dans le paludisme sévère. Il s'agit d'un constat rarement rapporté dans les études antérieures en raison de l'hypothèse de séquestration parasitaire dans des organes comme le cerveau en cas de neuropaludisme [68]. Ce résultat pourrait être lié au

seuil de 4% de parasitémie, choisi par l’OMS pour définir les cas sévères [6,14]. Les thrombopénies sont plus fréquentes dans le paludisme grave; ils constituent un marqueur biologique de sévérité de l’infection à *P. falciparum* très largement rapporté [4] en raison surtout du rôle joué par les plaquettes dans la pathogénèse du paludisme. La thrombopénie est probablement liée à l’activation des plaquettes via l’interaction entre le *PfEMP1* parasite et la molécule CD36 de la surface plaquettaire. Les plaquettes activées peuvent former des micro-agrégats avec GRp et obstruer les vaisseaux sanguins [66].

Le taux d’hémoglobine, de bicarbonates sanguins, et le pH sont plus faibles dans les accès graves mortels et apparaissent à nouveau comme des marqueurs à valeur pronostique [40,129] . L’hyperleucocytose décrite chez les patients décédés constitue l’un des résultats non moins importants de notre étude et des observations similaires ont été récemment publiées dans une étude thaïlandaise qui ne rapporte pas de variations des taux d’hémoglobine et de plaquettes suivant l’issue du paludisme de réanimation [130] . Les mécanismes immunopathologiques sur lesquels reposent ces variations biologiques ne sont pas directement imputables au parasite notamment à sa forte présence au niveau du sang. Ainsi, nous avons retrouvé des parasitémies plus faibles chez les patients ayant survécu aux accès graves, mais aucune corrélation n’a été mise en évidence entre ces densités parasitaires et le taux d’un quelconque paramètre biologique. Ce dernier résultat est contraire à celui des travaux de **Moulin et al.** ayant rapporté une association entre les taux plaquettes et les parasitémies dans le paludisme compliqué de l’enfant [131]. La variabilité de la symptomatologie palustre suivant l’endémicité, l’influence de l’âge des patients sur l’évolution de la maladie, les similitudes entre le paludisme et certaines maladies infectieuses ou non infectieuses, la possibilité d’une association avec d’autres pathologies pouvant être bénignes ou malignes demeurent un ensemble de facteurs pouvant expliquer la discordance entre nos résultats provenant surtout de patients adultes et ceux de **Moulin et al.**

Les caractéristiques des réponses immunes

Elles portent sur l'apport de l'étude pour mieux cerner les déterminants de la réponse immunitaire dans le cadre du paludisme grave afin de dégager une cible importante pour la protection. Des travaux antérieurs ont montré que le mérozoïte est une cible critique dans les mécanismes de protection contre l'infection à *P. falciparum*, les facteurs exacts du point de vue fonctionnel restent à élucider. Parmi les principaux candidats vaccins associés au mérozoïte et ayant atteint le stade des essais cliniques on note MSP1 et AMA-1 [123].

Nos résultats ont montré de fortes prévalences des réponses IgG anti-mérozoïtes chez l'ensemble des individus quelle que soit la gravité de l'accès palustre avec au moins la moitié des patients répondeurs. Ces données témoignent d'une forte stimulation du système immunitaire dirigé contre le stade mérozoïte de *P. falciparum*. Le nombre de patients répondeurs en IgG est beaucoup plus élevé pour les deux protéines recombinantes testées que pour l'extrait de mérozoïte. Cependant, seule la variation observée avec les IgG anti-MSP1p19 est discriminante suivant la gravité palustre avec une prévalence de répondeurs plus forte dans le paludisme sévère. En Inde, des différences d'incidences et de niveaux d'IgG anti-MSP1p19 ont été rapportées par **Naomi et al.** qui montrent cependant des réponses plus fortes dans l'accès palustre non aggravé comparé aux formes graves [132].

Les intensités retrouvées pour les réponses IgG anti-MSP1p19, se rapprochent de celles des individus prémunis (Ndiop) [133] et de manière beaucoup plus nette dans les cas de paludisme « simple».

Suivant l'issue du paludisme de réanimation, la stimulation du système immunitaire est notable en ce qui concerne les réponses IgM et surtout IgG globalement fortes. Nous avons retrouvé une hausse significative des taux d'IgM anti-mérozoïtes chez les survivants comparés au groupe des malades décédés et une absence de variation des taux d'IgG contre le même Ag entre les deux groupes. Ces résultats pourraient être reliés aux délais d'hospitalisation des patients car les taux élevés d'IgM témoignent de l'existence d'une infection récente. La prise en charge

plus précoce chez les survivants a été rapporté dans la mise au point de **Rogerson et al.** notamment pour ce qui est son association avec la réponse immunitaire et l'issue du patient [134].

Aucune variation des réponses Ac n'est constatée suivant l'âge des patients, un tel résultat confirme les données antérieurement retrouvées par **Mbengue et al.** dans le paludisme urbain à Dakar [119,127,128]. En effet, adultes et enfants répondent de la même manière

Les niveaux de réponse IgG anti-AMA1 sont plus élevés chez les survivants du paludisme de réanimation. Suivant la gravité, ces réponses Ac sont discriminantes car plus fortes dans le paludisme simple. Nos données permettent de conclure de l'existence d'effets protecteurs de ces IgG anti-AMA1. Retrouvé également avec la protéine MSP1p19 suivant l'issue des patients, il s'agit d'un effet bénéfique précédemment décrit pour les sous-classes d'IgG1 et d'IgG3 anti-MSP1p19 [135,136].

Dans tous les cas, la question reste à déterminer le mécanisme d'action propre à ces immunoglobulines anti-protéines de mérozoïtes: des IgG anti-AMA1 et surtout des IgG anti-MSP1p19 qui sont les plus corrélées à la réponse contre l'extrait total dans les cas de paludisme simples et chez les survivants du paludisme de réanimation. En outre, l'intérêt d'une exploration du caractère fonctionnel de ces IgG contre MSP1p19 repose sur les tendances d'une protection observée vis-à-vis de l'anémie dans le paludisme simple

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a été réalisé avec une population d'étude comprenant des patients atteints de paludisme « simple » ou de paludisme grave. Nous avons étudié les niveaux de réponses Ac dirigées contre le mérozoïte de *P. falciparum*, et deux protéines candidats vaccins en phase avancée de développement (MSP1p19 et AMA-1). Les résultats obtenus ont été analysés en fonction de l'âge, du taux d'hémoglobine, de la parasitémie, de l'état ou du pronostic des malades.

Les Ag de *P. falciparum* sont des cibles fortement reconnues dans le cas du paludisme de réanimation car les prévalences et les niveaux de réponses Ac sont proches de celles retrouvées dans des zones endémiques.

Dans les cas mortels, nous avons pu mettre en évidence les déficits de réponses IgG contre MSP1p19 et AMA-1 des antigènes clés du mérozoïte. De tels résultats doivent être pris en compte dans le cadre de la définition d'une population cible pour une future et éventuelle vaccination « préventive ».

Toutefois, l'évaluation de la fonctionnalité des Ac ainsi que celle de la capacité des sérums à induire une phagocytose immune des mérozoïtes pourraient compléter ce type de travail.

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

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIES

REFERENCES

1. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, et al. (2008) *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. Clin Infect Dis 46: 165-171.
2. Price RN, Douglas NM, Anstey NM (2009) New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of chloroquine resistance. Curr Opin Infect Dis 22: 430-435.
3. Bhaumik S (2013) Malaria funds drying up: World Malaria Report 2012. Natl Med J India 26: 62.
4. Gay F, Zougbede S, N'Dilimabaka N, Rebollo A, Mazier D, et al. (2012) Cerebral malaria: what is known and what is on research. Rev Neurol (Paris) 168: 239-256.
5. Andrade BB, Barral-Netto M (2011) Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. Mem Inst Oswaldo Cruz 106 Suppl 1: 70-78.
6. Saissy JM, Rouvin B, Koulmann P (2003) [Severe malaria in intensive care units in 2003]. Med Trop (Mars) 63: 258-266.
7. Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, et al. (2010) Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. JAMA 303: 638-647.
8. Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, et al. (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet 363: 1017-1024.
9. Miller LH, Good MF, Milon G (1994) Malaria pathogenesis. Science 264: 1878-1883.
10. Desowitz RS (1991) The Malaria Capers More Tales of Parasites and People, Research and Reality: .
11. OMS (2011) World Malaria Report 2011. 1-246.
12. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, et al. (2012) Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. Lancet 379: 413-431.
13. Behr J (2011, 17 mai) Recommandations sanitaires pour les voyageurs. 18-19
14. OMS (2000) Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. Trans R Soc Trop Med Hyg 94 Suppl 1: S1-90.
15. PNLP (Juillet 2011) Rapport Statistiques PNLP-2009. 1-87.
16. Faye FB, Spiegel A, Tall A, Sokhna C, Fontenille D, et al. (2002) Diagnostic criteria and risk factors for *Plasmodium ovale* malaria. J Infect Dis 186: 690-695.
17. Trape JF, Rogier, C., Konate, L., Diagne, N., Bouganali, H., Canque, B., Legros, F., Badji, A., Ndiaye, G., and Ndiaye, P (1994) The Dielmo project: a longitudinal study of natural malaria infection and the mechanisms of protective immunity in a community living in a holoendemic area of Senegal. Am J Trop Med Hyg 51: 123-137.
18. Dia D, Dieng MT, Sy Ndiaye T, Fall S, Ndongo S, et al. (2003) [Behcet's disease in Dakar (Senegal): epidemiological and clinical features]. Dakar Med 48: 64-67.
19. Carne B (1993) Indices Plasmodiques et charges parasitaires chez des donneurs de sang à Brazzaville CONGO.
20. Salem G LGF (1994) Espace urbain et risque anophélien à Pikine (Sénégal). cahier santé 1: 347-394.
21. Voitenko NN, Maslova LN, Trapezov OV, Kharlamova AA (1992) [Brain monoamine oxidase in mink selected for their reaction to man]. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova 42: 537-542.
22. Gazin P (1991) Le paludisme en Afrique au Sud du Sahara: comparaison entre milieux urbain et ruraux. Cahier santé 10: 221-229.
23. Diallo S, Konate L, Ndir O, Dieng T, Dieng Y, et al. (2000) [Malaria in the central health district of Dakar (Senegal). Entomological, parasitological and clinical data]. Sante 10: 221-229.

24. Diallo S, Konate L, Faye O, Ndir O, Faye M, et al. (1998) [Malaria in the southern sanitary district of Dakar (Senegal). 2. Entomologic data]. *Bull Soc Pathol Exot* 91: 259-263.
25. Fondjo F. RV, Le Golf G.,Toto J.C et Carnevale P. (1993) Le paludisme urbain à Yaoundé. *Bull Soc Pathol Exot* 85: 57-63.
26. carnevale PRV, Le Golf G et al. (1993) Données entomologiques sur le paludisme urbain en Afirque. *Cahier santé* 3: 758-765.
27. Rogier C, Trape JF (1995) [Study of premunition development in holo- and meso-endemic malaria areas in Dielmo and Ndiop (Senegal): preliminary results, 1990-1994[]]. *Med Trop (Mars)* 55: 71-76.
28. Gaye O, Babou I, Faye O, Fall A, Molez JF, et al. (1993) [Malaria morbidity and therapeutic efficacy of antimalarials. Study conducted in the Dakar region]. *Med Trop (Mars)* 53: 479-485.
29. Rogier C (1998) Etude de l'histoire naturelle du paludisme à *Plasmodium falciparum* et des déterminants de l'acquisition de l'immunitéantipalustre en zone de forte endémie, village de Dielmo, Sénégal *Doctorat de troisième cycle:p240*.
30. Gaye O, Faye O, Ndir O, Feller-Dansokho E, Dieng Y, et al. (1997) [Malaria in an urban environment: the case of the city of Rufisque in Senegal]. *Dakar Med* 42: 54-58.
31. Gaye O, Faye O, Bah IB, Diallo S, Diouf M, et al. (1991) [Development of chloroquine resistance in an urban area. Results of surveys in Dakar and Pikine]. *Ann Soc Belg Med Trop* 71: 329-330.
32. M.Wery (1995) *Protozoologie médicale*. P 1 à 276
33. Baruch DI, Gormely JA, Ma C, Howard RJ, Pasloske BL (1996) *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a parasitized erythrocyte receptor for adherence to CD36, thrombospondin, and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3497-3502.
34. Coetzee M, Fontenille D (2004) Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 599-605.
35. Fontenille D, Cohuet A, Awono-Ambene PH, Antonio-Nkondjio C, Wondji C, et al. (2003) [Systematics and biology of *Anopheles* vectors of *Plasmodium* in Africa, recent data]. *Med Trop (Mars)* 63: 247-253.
36. Mouchet J CP, Coosemans M, Julvez J, Manguin S, Richard- Lenoble D, et al (2004) *Biodiversité du paludisme dans le monde*. Paris: John Libbey Eurotext; .
37. Pages F, Orlandi-Pradines E, Corbel V (2007) [Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection]. *Med Mal Infect* 37: 153-161.
38. Beier JC (1998) Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 43: 519-543.
39. Liehl P, Mota MM (2012) Innate recognition of malarial parasites by mammalian hosts. *Int J Parasitol* 42: 557-566.
40. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, et al. (2013) Malaria. *Lancet*.
41. Menard R (2007) [Malaria: parasite imaging unveils the intimacy of infection]. *Pathol Biol (Paris)* 55: 219-221.
42. Langreth SG, Peterson E (1985) Pathogenicity, stability, and immunogenicity of a knobless clone of *Plasmodium falciparum* in Colombian owl monkeys. *Infect Immun* 47: 760-766.
43. Cowman AF, Crabb BS (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* 124: 755-766.
44. Bannister LH, Mitchell GH (1989) The fine structure of secretion by *Plasmodium knowlesi* merozoites during red cell invasion. *J Protozool* 36: 362-367.
45. Bannister LH, Mitchell GH, Butcher GA, Dennis ED, Cohen S (1986) Structure and development of the surface coat of erythrocytic merozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Cell Tissue Res* 245: 281-290.

46. Miller LH, Roberts T, Shahabuddin M, McCutchan TF (1993) Analysis of sequence diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP-1). *Mol Biochem Parasitol* 59: 1-14.
47. Tanabe K, Mackay M, Goman M, Scaife JG (1987) Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Mol Biol* 195: 273-287.
48. Koussis K, Withers-Martinez C, Yeoh S, Child M, Hackett F, et al. (2009) A multifunctional serine protease primes the malaria parasite for red blood cell invasion. *EMBO J* 28: 725-735.
49. Gilson PR, Nebl, T., Vuckcevic, D., Moritz, R. L., Sargeant, T., Speed, T. P., Schofield, L., and Crabb, B. S. (2006) Identification and stoichiometry of GPI-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Am Soc Biochem Mol Biol* 5: 1286-1299.
50. Holder AA (2009) The carboxy-terminus of merozoite surface protein 1: structure, specific antibodies and immunity to malaria. *Parasitology* 136: 1445-1456.
51. Crewther PE, Culvenor JG, Silva A, Cooper JA, Anders RF (1990) *Plasmodium falciparum*: two antigens of similar size are located in different compartments of the rhoptry. *Exp Parasitol* 70: 193-206.
52. Peterson MG, Coppel RL, Moloney MB, Kemp DJ (1988) Third form of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Biol* 8: 2664-2667.
53. Narum DLT, A. W. (1994) Differential localization of full-length and processed forms of PF83/AMA-1 an apical membrane antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites. , , . *Mol Biochem Parasitol* 67: 59-68.
54. Hodder An, Crewther, P. E., Matthew, M. L., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J. & Anders, R. F. T., (1996) The disulfide bond structure of *Plasmodium* apical membrane antigen-1. *J Biol Chem* 271: 29446-29452.
55. Pizarro JC, Vulliez-Le Normand, B., Chesne-Seck, M. L., Collins, C. R., Withers-Martinez, C., Hackett, F., Blackman, M. J., Faber, B. W., Remarque, E. J., Kocken, C. H., Thomas, A. W. & Bentley, G. A. , (2005) Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. *Science* 308.
56. Mitchell GH, Thomas, A. W., Margos, G., Dlugowski, A. R. & Bannister, L. H. (2004) Apical membrane antigen 1, a major malaria vaccine candidate, mediates the close attachment of invasive merozoites to host red blood cells. *Infect Immun* 72.
57. Kato K, Mayer, D. C., Singh, S., Reid, M. & Miller, L. H. (2005) Domain III of *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 binds to the erythrocyte membrane protein Kx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5552-7.
58. Silvie O, Franetich, J. F., Charrin, S., Mueller, M. S., Siau, A., Bodescot, M., Rubinstein, E., Hannoun, L., Charoenvit, Y., Kocken, C. H., Thomas, A. W., et Al (2004) A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem* 279.
59. Malvy D DF, Thiebaut R, Le Bras M (2000) *Plasmodies*-Malaria. Formes cliniques et diagnostic. *Encyclopédie médico-chirurgicale Paris, Elsevier* 8.
60. Juliano WCMJJ (2006) Paludisme. SECTION X j Maladies infectieuses 824-830.
61. Saïssy J (2001) Paludisme grave. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale* 36-984-B-10: 1-12.
62. Bruneel F, Hocqueloux L, Alberti C, Wolff M, Chevret S, et al. (2003) The clinical spectrum of severe imported *falciparum* malaria in the intensive care unit: report of 188 cases in adults. *Am J Respir Crit Care Med* 167: 684-689.
63. (1990) Severe and complicated malaria. World Health Organization, Division of Control of Tropical Diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84 Suppl 2: 1-65.
64. Idro R, Jenkins NE, Newton CR (2005) Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol* 4: 827-840.

65. Kirchgatter K, Del Portillo HA (2005) Clinical and molecular aspects of severe malaria. *An Acad Bras Cienc* 77: 455-475.
66. Coltel N, Combes V, Hunt NH, Grau GE (2004) Cerebral malaria - a neurovascular pathology with many riddles still to be solved. *Curr Neurovasc Res* 1: 91-110.
67. Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, et al. (1995) The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* 82: 89-100.
68. Ho M, White NJ (1999) Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol* 276: C1231-1242.
69. Newbold C, Craig A, Kyes S, Rowe A, Fernandez-Reyes D, et al. (1999) Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 29: 927-937.
70. David PH, Hommel M, Miller LH, Udeinya IJ, Oligino LD (1983) Parasite sequestration in *Plasmodium falciparum* malaria: spleen and antibody modulation of cytoadherence of infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5075-5079.
71. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, et al. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101: 1644-1655.
72. Grau GE, Piguet PF, Vassalli P, Lambert PH (1989) Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data. *Immunol Rev* 112: 49-70.
73. Grau GE, Piguet PF, Vassalli P, Lambert PH (1989) Involvement of tumour necrosis factor and other cytokines in immune-mediated vascular pathology. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88: 34-39.
74. Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, et al. (1990) TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 336: 1201-1204.
75. Grau GE, Pointaire P, Piguet PF, Vesin C, Rosen H, et al. (1991) Late administration of monoclonal antibody to leukocyte function-antigen 1 abrogates incipient murine cerebral malaria. *Eur J Immunol* 21: 2265-2267.
76. Orago AS, Facer CA (1993) Cytokine-induced inhibition of *Plasmodium falciparum* erythrocytic growth in vitro. *Clin Exp Immunol* 91: 287-294.
77. Doolan DL, Hoffman SL (1999) IL-12 and NK cells are required for antigen-specific adaptive immunity against malaria initiated by CD8+ T cells in the *Plasmodium yoelii* model. *J Immunol* 163: 884-92.
78. Ockenhouse CF, Shear HL (1984) Oxidative killing of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium yoelii* by activated macrophages. *J Immunol* 132: 424-431.
79. Looareesuwan S, Wilairatana P, Krishna S, Kendall B, Vannaphan S, et al. (1995) Magnetic resonance imaging of the brain in patients with cerebral malaria. *Clin Infect Dis* 21: 300-309.
80. (2006) WHO calls for an immediate halt to provision of single-drug artemisinin malaria pills. New malaria treatment guidelines issued by WHO. *Saudi Med J* 27: 574-575.
81. Pédiatrie, Société française de pédiatrie;(2008) Recommendations for clinical practice. Management and prevention of imported *Plasmodium falciparum* malaria. (Revision 2007 of the 1999 Consensus conference). *Med Mal Infect*
82. van Hensbroek MB, Onyiorah E, Jaffar S, Schneider G, Palmer A, et al. (1996) A trial of artemether or quinine in children with cerebral malaria. *N Engl J Med* 335: 69-75.
83. Hanson J, Lee SJ, Mohanty S, Faiz MA, Anstey NM, et al. (2010) A simple score to predict the outcome of severe malaria in adults. *Clin Infect Dis* 50: 679-685.

84. Imbert P, Sartelet I, Rogier C, Ka S, Baujat G, et al. (1997) Severe malaria among children in a low seasonal transmission area, Dakar, Senegal: influence of age on clinical presentation. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91: 22-24.
85. Waller D, Krishna S, Crawley J, Miller K, Nosten F, et al. (1995) Clinical features and outcome of severe malaria in Gambian children. *Clin Infect Dis* 21: 577-587.
86. Weber MW, Zimmermann U, van Hensbroek MB, Frenkel J, Palmer A, et al. (1999) Renal involvement in Gambian children with cerebral or mild malaria. *Trop Med Int Health* 4: 390-394.
87. Barsoum RS (1998) Malarial nephropathies. *Nephrol Dial Transplant* 13: 1588-1597.
88. Souweine B HA, Deteix P. (2001) In : JM Saissy Paludisme grave: Insuffisance rénale aiguë au cours du paludisme. Paris : Arnette: 93-102.
89. Imbert P BA (2002) Paludisme de l'enfant : In *Maladies infectieuses Pédiatrie. Encycl Méd Chir ; Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris: 24.*
90. Ayyub M, Barlas S, Lubbad E (2000) Usefulness of exchange transfusion in acute liver failure due to severe *falciparum* malaria. *Am J Gastroenterol* 95: 802-804.
91. Enwere G, Van Hensbroek MB, Adegbola R, Palmer A, Onyiora E, et al. (1998) Bacteraemia in cerebral malaria. *Ann Trop Paediatr* 18: 275-278.
92. Murthy GL, Sahay RK, Sreenivas DV, Sundaram C, Shantaram V (1998) Hepatitis in *falciparum* malaria. *Trop Gastroenterol* 19: 152-154.
93. Srivastava A, Khanduri A, Lakhtakia S, Pandey R, Choudhuri G (1996) *Falciparum* malaria with acute liver failure. *Trop Gastroenterol* 17: 172-174.
94. Kawo NG, Msengi AE, Swai AB, Chuwa LM, Alberti KG, et al. (1990) Specificity of hypoglycaemia for cerebral malaria in children. *Lancet* 336: 454-457.
95. Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Fletcher KA, Morris K (1988) Blood glucose levels in Malawian children before and during the administration of intravenous quinine for severe *falciparum* malaria. *N Engl J Med* 319: 1040-1047.
96. White NJ, Miller KD, Marsh K, Berry CD, Turner RC, et al. (1987) Hypoglycaemia in African children with severe malaria. *Lancet* 1: 708-711.
97. Pussard E, Barennes H, Daouda H, Clavier F, Sani AM, et al. (1999) Quinine disposition in globally malnourished children with cerebral malaria. *Clin Pharmacol Ther* 65: 500-510.
98. Sergent E (1950) [Definition of immunity & premunition]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 79: 786-797.
99. Struik SS, Riley EM (2004) Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev* 201: 268-290.
100. Deloron P, Chougnet C (1992) Is immunity to malaria really short-lived? *Parasitol Today* 8: 375-378.
101. Kumaratilake LM, Ferrante A, Jaeger T, Rzepczyk CM (1992) Effects of cytokines, complement, and antibody on the neutrophil respiratory burst and phagocytic response to *Plasmodium falciparum* merozoites. *Infect Immun* 60: 3731-3738.
102. Kharazmi A, Jepsen S (1984) Enhanced inhibition of in vitro multiplication of *Plasmodium falciparum* by stimulated human polymorphonuclear leucocytes. *Clin Exp Immunol* 57: 287-292.
103. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27: 669-692.
104. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22: 633-640.
105. Artavanis-Tsakonas K, Eleme K, McQueen KL, Cheng NW, Parham P, et al. (2003) Activation of a subset of human NK cells upon contact with *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J Immunol* 171: 5396-5405.

106. Baratin M, Roetynck S, Lepolard C, Falk C, Sawadogo S, et al. (2005) Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 14747-14752.
107. Liu K, Nussenzweig MC (2010) Origin and development of dendritic cells. Immunol Rev 234: 45-54.
108. Schofield L, Grau GE (2005) Immunological processes in malaria pathogenesis. Nat Rev Immunol 5: 722-735.
109. Cramer JP, Lepenies B, Kamena F, Holscher C, Freudenberg MA, et al. (2008) MyD88/IL-18-dependent pathways rather than TLRs control early parasitaemia in non-lethal *Plasmodium yoelii* infection. Microbes Infect 10: 1259-1265.
110. Farouk SE, Mincheva-Nilsson L, Krensky AM, Dieli F, Troye-Blomberg M (2004) Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. Eur J Immunol 34: 2248-2256.
111. Taylor-Robinson AW, Phillips RS, Severn A, Moncada S, Liew FY (1993) The role of TH1 and TH2 cells in a rodent malaria infection. Science 260: 1931-1934.
112. Schofield L, Villaquiran J, Ferreira A, Schellekens H, Nussenzweig R, et al. (1987) Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites. Nature 330: 664-666.
113. Pombo DJ, Lawrence G, Hirunpetcharat C, Rzepczyk C, Bryden M, et al. (2002) Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. Lancet 360: 610-617.
114. Stevenson MM, Riley EM (2004) Innate immunity to malaria. Nat Rev Immunol 4: 169-180.
115. Perlmann P, Troye-Blomberg M (2000) Malaria blood-stage infection and its control by the immune system. Folia Biol (Praha) 46: 210-218.
116. Schreiber N, Brattig N, Evans J, Tsiri A, Horstmann RD, et al. (2006) Cerebral malaria is associated with IgG2 and IgG4 antibody responses to recombinant *Plasmodium falciparum* RIFIN antigen. Microbes Infect 8: 1269-1276.
117. Mendis KN, Targett GA (1981) Immunization to produce a transmission-blocking immunity in *Plasmodium yoelii* malaria infections. Trans R Soc Trop Med Hyg 75: 158-159.
118. Gwadz RW, Carter R, Green I (1979) Gamete vaccines and transmission-blocking immunity in malaria. Bull World Health Organ 57 Suppl 1: 175-180.
119. Perraut R, Mercereau-puijalon, O., Diouf, B., Tall, A., Guillotte, M., Le Scanf, C., Trape, J. F., Spiegel, A., and Garraud, O. (2000) Seasonal fluctuation of antibody levels to *Plasmodium falciparum* parasitized red blood cell-associated antigens in two senegalese villages with different transmission conditions. Am J Trop Med Hyg 62: 746-751.
120. Playfair A, Taverne, J., Bate, C., and Desouza, J. B. (1990) The malaria vaccine: anti-parasite and anti-disease. Immunol Today 11.
121. Egan A. F. BMJKDC (2000) Vaccine efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in malarian naive exposed and/or rechallenged Aotus vociferans monkeys. Infection & Immunity 68: 1418-1427.
122. Ogutu BR, Apollo, O. J., Mckinney, D., Okoth, W., Siangla, J., Dubovsky, F., Tucker, K., Waitumbi, J. N., Diggs, C., Wittes, J., Malkin, E., Leach, A., Soisson, L. A., Milman, J. B., Otieno, L., et Al. (2009) Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. PLoS One 4.
123. Schwartz L, Brown GV, Genton B, Moorthy VS (2012) A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. Malar J 11: 11.
124. Kennedy MC, Wang J, Zhang Y, Miles AP, Chitsaz F, et al. (2002) In vitro studies with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1): production and

- activity of an AMA1 vaccine and generation of a multiallelic response. *Infect Immun* 70: 6948-6960.
125. Saul A, Lawrence G, Allworth A, Elliott S, Anderson K, et al. (2005) A human phase 1 vaccine clinical trial of the *Plasmodium falciparum* malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1 in Montanide ISA720 adjuvant. *Vaccine* 23: 3076-3083.
 126. De Gentile L GF (2000) Le paludisme d'importation : diagnostic au laboratoire. *Rev Fr Lab* 321: 25-29.
 127. Mbengue B, Niang B, Diatta B, Tall A, Garraud O, et al. (2010) The use of crude *Plasmodium falciparum* antigens for comparison of antibody responses in patients with mild malaria vs. cerebral malaria. *Iran J Immunol* 7: 150-161.
 128. Mbengue B, Sylla Niang M, M. DA, Tall A, Touré A, et al. (2010) antibodies responses to *Plasmodium falciparum* blood stage crude extract in symptomatic patients living in an urban, low endemic area of dakar(SENEGAL). *Dakar Med* 55.
 129. Maitland K, Newton CR (2005) Acidosis of severe falciparum malaria: heading for a shock? *Trends Parasitol* 21: 11-16.
 130. Noppadon Tangpukdee KMW, Sant Muangnoicharoen, Shigeyuki Kano, Nanthaporn Phophak, Janram Tiemprasert, Srivicha Krudsood, Polrat Wilairatana. (2010) Indicators of fatal outcome in severe *Plasmodium falciparum* malaria: a study in a tertiary-care hospital in Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*: 855-859.
 131. Moulin F, Lesage F, Legros AH, Maroga C, Moussavou A, et al. (2003) Thrombocytopenia and *Plasmodium falciparum* malaria in children with different exposures. *Arch Dis Child* 88: 540-541.
 132. Lucchi NW, Tongren JE, Jain V, Nagpal AC, Kauth CW, et al. (2008) Antibody responses to the merozoite surface protein-1 complex in cerebral malaria patients in India. *Malar J* 7: 121.
 133. Perraut R, Mercereau-puijalon O, Diouf B, Tall A, Guillotte M, et al. (2000) Seasonal fluctuation of antibody levels to *Plasmodium falciparum* parasitized red blood cell-associated antigens in two senegalese villages with different transmission conditions. *Am J Trop Med Hyg* 62: 746-751.
 134. Rogerson SJ, Wijesinghe RS, Meshnick SR (2010) Host immunity as a determinant of treatment outcome in *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Infect Dis* 10: 51-59.
 135. Duah NO, Miles DJ, Whittle HC, Conway DJ (2010) Acquisition of antibody isotypes against *Plasmodium falciparum* blood stage antigens in a birth cohort. *Parasite Immunol* 32: 125-134.
 136. MBENGUE B (2001) Facteurs biologiques de gravité du paludisme à *Plasmodium falciparum* : Implications immunologiques et vaccinales. thèse pharm 64.

ANNEXES

ANNEXE I: FICHE DE RECRUTEMENT



ETUDE DES FACTEURS DE GRAVITE DU PALUDISME DE REANIMATION

N° de fiche (IPD) :.....

Date :..... Numéro de dossier (HPD°):.....

Prénoms :.....

Noms :.....

Age:..... Lieu de naissance :.....

Sexe :..... Ethnie:.....

Adresse la plus complète possible (BP, Tel, Fax, email) :.....

.....

.....

Résident Non résident

Voyage lors des trois derniers mois

OUI Lieu :.....

NON

Prélèvements

Date de prélèvement	Type de tube	Laboratoire	Nombre de tube
J0 (...../...../.....)			
J1 (...../...../.....)			
J2 (...../...../.....)			

Autres observations :.....

.....

CLINIQUE ET PARACLINIQUE

Dysfonctionnements d'organes

-- Défaillance neurologique

Score de Glasgow (adulte < 14)

± Neuropaludisme si

Score de Glasgow (Enfant < 9).....

oui	non
------------	------------

-- Défaillance respiratoire

PaO2

SaO2.....

PCO2.....

COT.....

BE.....

oui	non
------------	------------

-- Défaillance hépatique

Bilirubine totale (> 50µmol/L).....

Bilirubine conjuguée

SGOT..... SGPT.....

oui	non
------------	------------

Na..... K..... DEXTRO.....Protides.....

-- Défaillance cardiovasculaire

TA (PAS< = 90 mmHg)

ou PA Moyenne (< = 70 mmHg).....

Pouls.....

oui	non
------------	------------

-- Défaillance rénale

Diurèse (<0,5ml/Kg)

Avec créat (<265µmol/L ou 30 mg/L)

.....

urée

oui	non
------------	------------

-- Défaillance de l'hémostase

Plaquettes (< 20G /L).....

Hb Ht

GR..... GB

VGM.....TP

oui	non
------------	------------

Dysfonctionnements métaboliques

-- Acidose métabolique

Bicarbonates plasmatiques (<15 mmol/L)

.....

± Acidémie (avec pH < 7,35)

oui	non
------------	------------

--Hypoglycémie

Glycémie (<2,2mmol/L ou <0,4g/L).....

.....

oui	non
------------	------------

Autres signes

- Saignements
- Ictères
- Hémoglobinurie
- Autres

Parasitologie

TEST	J0	J1	J2
GE (HPD)			
FROTTIS (IPD)			
Test ICT			

Date d'entrée :..... Date de sortie :.....

MOTIF D'HOSPITALISATION

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

ANTECEDENTS

.....
.....

TRAITEMENT ET HOSPITALISATION ANTERIEURS

OUI / NON

Si oui

Médicaments	Posologie	Durée	Lieux

CHIMIOPROPHYLAXIE:

OUI / NON

Si oui,

Médicaments	Posologie	Durée

AUTRES REMARQUES:

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

ANNEXE II: EVALUTION DU STADE DU COMA

ECHELLE DE GLASGOW

Il est utilisé pour la détermination du stade du coma chez les adultes et les enfants âgés (plus de 12 ans).

Nature	Résultats	Cotation
Yeux ouverts (Y)	Spontanément	4
	pour parler	3
	à la douleur	2
	jamais	1
Meilleure réponse verbale (V)	orientée	5
	confuse	4
	choix des mots inappropriés	3
	sons incompréhensibles	2
	aucune	1
Meilleure réponse motrice (M)	obéit aux ordres	5
	localise la douleur	4
	flexion à la douleur: retrait	3
	extension à la douleur	2
	aucune	1
Total		3 à 14

Pour calculer le score de Glasgow, prendre le score de chaque section, ensuite additionner les trois chiffres pour obtenir un score total.

$$\text{Score de Glasgow} = Y+V+M = 3 \text{ à } 15$$

NB: 7 est un score charnière en dessous duquel se situe l'état de coma grave.

ECHELLE DE BLANTYRE

Il est utilisé pour la détermination du stade du coma chez les enfants âgés de 9 mois à 12 ans. La mesure du coma chez les enfants plus petits est difficile. Le mieux est de décrire la façon dont l'enfant répond à un stimulus douloureux standard.

Nature	Résultats	Cotation
Mouvements des Yeux (Y)	orienté (suit le visage de la mère)	1
	non orienté	0
Réponse verbale (V)	appropriée pour l'âge (cri)	2
	inappropriée pour l'âge (cri) ou gémissement	1
	hoquet/aucune	0
Meilleure réponse motrice (M)	localisation du stimulus douloureux*	2
	retrait du membre à la douleur**	1
	réponse non spécifique ou absente	0
Total		0 à 5

* frotter vos articulations des doigts fermement sur le sternum du patient.

** appuyer fermement sur le lit de l'ongle du pouce du patient avec un crayon tenu horizontalement.

Pour calculer le score de Blantyre, prendre le score de chaque section, ensuite additionner les trois chiffres pour obtenir un score total.

$$\text{Score de Blantyre} = Y+V+M = 0 \text{ à } 5$$

Interprétation:

Normal :	5
Obnubilation :	4
Coma de stade II:	3-2
Coma de stade III:	1
Coma de stade IV:	0

Remerciements

La présente étude a été réalisée en partie grâce à un financement du **Grant Débonder-Clayton 2012** et **Rotary International**

