

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	2
LISTE DES ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION	4
PREMIERE PARTIE: CARACTERISTIQUES GENERALES DU PALUDISME	
I. DEFINITION ET HISTORIQUE	5
II. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME : LA REPARTITION GEOGRAPHIQUE.....	5
III. BIOLOGIE DES PLASMODIUMS.....	6
III.1. Agents pathogènes	6
III.2. Les vecteurs	6
III.3. LE cycle de <i>p. falciparum</i>	7
IV. PATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR <i>P. FALCIPARUM</i>	9
IV.1. Accès Palustre simple.....	9
IV.2. Paludisme grave	10
V. L'IMMUNITE ANTI PALUSTRE	13
V.1.Immunité innée anti palustre:	13
V.2.Immunité spécifique dans le paludisme.....	14
VI. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET APPROCHE METHODOLOGIQUE	16
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS	
I. CADRE D'ETUDE :	17
II. MATERIELS ET METHODES	17
II.1.Matériels	17
II.1.1.Matériel du laboratoire :.....	17
II.1.2.Réactifs :	18
II.1.3.Population d'étude et Matériel biologique.....	18
II.2. Méthodologie	19
II.2.1. La séparation cellulaire par gradient de Ficoll	19
II.2.1.1. Principe	19
II.2.1.2. Mode opératoire	19
II.2.2. Marquage cellulaire	Erreur ! Signet non défini.
II.2.3. Technique de cytométrie en flux.....	20

II.2.4. Acquisition et Analyse des données	21
III. RESULTATS.....	25
III.1. Caractéristiques clinico-biologiques de la population d'étude.....	Erreur ! Signet non défini.
III.2. Variations des niveaux d'activation lymphocytaire T	25
III.2.1. Comparaison des proportions de cellules T activées entre les malades et les témoins	25
III.2.2. Comparaison des proportions de cellules T activées suivant l'issue du paludisme sévère	26
III.3. Interrelations entre les niveaux d'activation cellulaire dans la population d'étude.....	27
III.4. Variations suivant les données hématoparasitologiques	28
III.4.1. Comparaison suivant les densités parasitaires	28
IV. DISCUSSION	30
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	33
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	34
ANNEXES.....	37

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Cycle évolutif du *Plasmodium falciparum*

Figure 2 : Physiopathologie du paludisme grave

Figure 3 : Interactions hôte-parasite et mécanisme immunologique

Figure 4 : Procédures de détermination des proportions de lymphocytes avec le logiciel Flow Jo

Figure 5 : Variations des niveaux d'activation suivant la gravité des accès et chez les témoins

Figure 6 : Comparaisons des proportions de cellules T activées suivant l'issue des accès grave

Figure 7 : Variations des niveaux d'activations cellulaires suivant la parasitémie dans les deux types d'accès : (a et b) paludisme grave et (c et d) paludisme simple.

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 : Caractéristiques épidémiologiques et clinico-biologiques des cas et des témoins à l'inclusion

Tableau IV : Interrelations entre le niveau d'activation cellulaire dans le paludisme grave

Tableau V : Interrelations entre le niveau d'activation cellulaire dans le paludisme simple

Tableau VI : Interrelations entre les niveaux d'activation cellulaire et le taux de plaquettes

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac: Anticorps

AMA1: Apical membrane antigen 1

APC: Allophycocyanine

BCR: B-Cell Receptor

BSA: Bovine Sérum Albumin

CD: Classe de différenciation

CTLA: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen

EDTA: Ethylène Diamine Tétracétate

FACS: Fluorescence Activated Cell-Sorting

FITC: Isothiocyanate de fluorescéine

FSC: Forward Scatter

GR: Globule Rouge

HLA : Human Leucocyte Antigen

HPD : Hôpital Principal de Dakar

IFN : Interféron

Ig : immunoglobuline

IL: Interleukine

IPD: Institut Pasteur de Dakar

LABM : Laboratoire d'Analyse de Biologie Médicale

LB: Lymphocyte B

L-glu: L-glutamine

LT : Lymphocyte T

NK: Natural killer

NFS : Numération de Formule Sanguine

OMS: Organisation mondiale de la santé

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell

PBS: Phosphate Buffered Saline

PAF: platelet-activating factor

PS: Pénicilline Streptomycine

PE: Phycoérythrine

PerCP : chlorophylle Peridinine protéine

RBCs: Red Blood Cells

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SVF: Sérum de veau fœtal

SSC: Side Scatter

TCR: T-Cell Receptor

Th: Cellule T helper

TNF: Tumor necrosis factor

INTRODUCTION

Le paludisme est un problème majeur de santé publique. En Afrique subsaharienne, il reste encore la première cause de décès chez les enfants. Environ 207 millions de cas et 627 000 décès dus au paludisme ont été recensés en 2012 à travers le monde [1]. *Plasmodium falciparum* est la principale espèce responsable des décès parmi les cinq espèces plasmodiales pouvant infecter l'homme.

La symptomatologie palustre est variable et elle résulte d'interactions multiples et complexes entre des facteurs de l'hôte, du parasite et de l'environnement [2]. Parmi ces interactions figurent les éléments de la réponse immunitaire de l'hôte dont l'objectif principal est de permettre la clairance parasitaire. Cette réponse protectrice repose sur un phénomène d'activation des cellules appartenant aux branches innée et/ou adaptative de l'immunité. Des avancées significatives ont été notées dans la compréhension du fonctionnement de ces cellules et de leur rôle protecteur ou physiopathologique. Comme la plupart des maladies infectieuses, le paludisme est marqué, durant sa phase clinique par une activation lymphocytaire encore mal élucidée et devant être exploré davantage dans le cadre de la mise en évidence de biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques du paludisme hospitalier.

Dans cette présente étude, nous proposons une évaluation de l'activation des lymphocytes T du sang périphérique par la recherche des marqueurs de surface CD69 et HLA-DR chez des patients hospitalisés pour un accès palustre grave ou souffrant du paludisme simple à *P. falciparum* et chez des sujets témoins indemnes d'infection palustre.

Rapport-Grauit.com

PREMIERE PARTIE :
CARACTERISTIQUES GENERALES DU PALUDISME

I. DEFINITION ET HISTORIQUE:

Le paludisme est une maladie infectieuse causée par un parasite eucaryote intracellulaire du genre *Plasmodium* et transmise par les moustiques femelles du genre Anophèles. La première description de la maladie se retrouve dans les écrits très anciens en Chine et en Egypte.

L'agent pathogène a été découvert en 1880 par **Alphonse Laveran** (Laveran, 1880) et c'est en 1897 que les moustiques *Anophèles* furent reconnus comme étant les vecteurs de la maladie. En 1922, quatre *Plasmodiums* infectant l'homme ont été décrits : *Plasmodium falciparum*, *P. malariae*, *P. vivax* et *P. ovale*. Une cinquième espèce *P. knowlesi* a été récemment retrouvée chez l'homme [3].

L'étude des hépatocytes a permis d'établir l'existence d'une phase du cycle parasitaire au niveau du foie, cette découverte faite avec *P. vivax* a été rapidement suivie par la mise en évidence du stade hépatique de l'espèce *P. falciparum*, stade pour lequel les connaissances restent encore très partielles [4].

En 1944, deux antipaludiques de synthèse la chloroquine et l'amodiaquine sont commercialisés et seront fortement utilisés. C'est en 1960, que les premières souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine ont été découvertes en Asie et en Amérique latine. Cette chimiorésistance apparaît de manière concomitante avec les résistances des anophèles à la dichlorodiphényl-trichloréthane ou DDT, utilisé depuis 1948. L'apparition sur le marché des combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine a apporté un regain d'espoir dans le cadre de la chimiothérapie antipaludique. Actuellement, un volet important dans la lutte antipaludique est l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides. Elles permettent de réduire le taux d'inoculation, donc l'incidence des fièvres, et diminuent ainsi la mortalité et la morbidité [5].

II. EPIDEMIOLOGIE DU PALUDISME

Selon l'OMS, 3,4 milliards de personnes ont été exposées au paludisme à travers le monde, en 2012. Parmi elles, 1,2 milliard de personnes vivaient dans des zones à haut risque principalement en Afrique et en Asie du Sud-Est. Entre 2000 et 2012, les taux de mortalité liée au paludisme ont chuté de 45 % dans toutes les tranches d'âge et de 51 % chez les enfants de moins de cinq ans [1].

Ainsi, le paludisme prédomine en zone intertropicale et reste une menace pour la santé et le développement socio-économique dans un grand nombre de pays tropicaux, particulièrement en Afrique Noire [6].

La distribution des différentes espèces plasmodiales dépend étroitement des conditions climatiques et de facteurs génétiques parasitaires et humains. En effet, *P. falciparum* est surtout retrouvée en Afrique sub-saharienne, tandis que *P. vivax* se rencontre principalement dans le subcontinent indien, en Amérique centrale et du Sud, en Afrique du Nord et au Moyen-Orient. *P. ovale* est retrouvée presque exclusivement en Afrique occidentale, et relativement peu de cas d'infection à *P. malariae* se produisent en Afrique [7]. *P. knowlesi* est maintenant reconnue comme une cause du paludisme humain potentiellement mortelle dans les zones forestières de l'Asie du Sud-Est [8].

La transmission palustre dépend également de la population vectorielle. Seule une soixantaine d'espèces vectorielles, appartenant au genre Anophèles, peuvent transmettre des *Plasmodiums* à l'homme. En Afrique, les vecteurs du paludisme appartiennent essentiellement à des complexes regroupant des espèces morphologiquement identiques mais ayant une biologie et des caractères génétiques variés. Ces différentes espèces ont des rôles vectoriels extrêmement différents [9].

Au Sénégal, le paludisme est un problème de santé publique en raison de sa fréquence et de sa létalité encore élevée. Dans ce pays au climat soudano-sahélien, la transmission palustre est intermittente, plus fréquente pendant l'hivernage, faible pour le reste de l'année avec une baisse des niveaux de transmission lorsqu'on passe du Nord au Sud [10].

Chez les enfants divers tableaux sont notés dont des formes graves, neurologiques ou une anémie, qui surviennent principalement pendant et après la saison des pluies qui durent environ trois mois [11].

III. BIOLOGIE DES *PLASMODIUMS*

III.1. Agents pathogènes

Cinq espèces plasmodiales peuvent être responsables de l'infection chez l'homme qui est le seul hôte réservoir: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi* [3].

- *P. falciparum* est l'espèce la plus répandue dans la zone intertropicale. Son incubation est de 7 à 12 jours et elle est responsable de la fièvre tierce maligne, de l'accès pernicieux. Elle évolue d'une seule tenue, sans rechutes.
- *P. vivax* a une répartition large mais elle est absente en Afrique noire. Responsable d'une fièvre tierce bénigne, sa durée d'incubation est variable de 15 jours à plusieurs mois, elle évolue avec des rechutes (accès de reviviscence).
- *P. ovale* est essentiellement retrouvée en Afrique noire, sa durée d'incubation est variable (15 jours à plusieurs années). Elle est très proche de *P. vivax*.
- *P. malariae* présente une répartition superposable à celle de *P. falciparum*. Elle est responsable d'une fièvre quarte et d'accès de reviviscence même après un très long délai.
- *P. knowlesi* a été identifiée en Asie du Sud-Est en particulier dans les zones boisées. Ce parasite est transmis par la piqûre de moustiques *Anopheles* [12].

III.2. Vecteurs

Sur plus de 3000 espèces de moustiques décrites dans le monde, seule une soixantaine, appartenant au genre Anophèles, peuvent transmettre les *Plasmodium* à l'homme.

En Afrique, les vecteurs de *Plasmodium* appartiennent essentiellement à des complexes, regroupant des espèces morphologiquement identiques mais ayant une biologie et des caractères génétiques variés.

Ces différentes espèces ont des rôles vectoriels extrêmement différents, dont notamment *A. arabiensis*, *A. gambiae*, *A. funestus*, *A. nili* et *A. moucheti* [9]. Seule la femelle est hématophage et pique préférentiellement le soir et la nuit. Il est à noter que seul moins de 20% des piqûres de moustiques contenant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires sont responsables d'infections en zone d'endémie.

III.3. Cycle de *P. falciparum*

Les parasites ont un cycle asexué chez l'homme et un cycle sexué chez l'anophèle femelle.

➤ Cycle chez l'anophèle

Lors d'un repas sanguin sur un individu infecté, l'Anophèle femelle ingère des gamétocytes, à potentiel sexuel mâle ou femelle. Ceux-ci parviennent dans l'estomac du moustique et se transforment en gamètes. Le gamète mâle subit un processus d'ex-flagellation à la suite duquel les gamètes femelles sont fécondés.

Il en résulte un zygote appelé ookinète; celui-ci s'implante sous la paroi stomacale en formant l'oocyste. Cette brève phase diploïde s'achève par une division méiotique et est suivie par plusieurs milliers de mitoses qui conduisent au développement de sporozoïtes. L'éclatement de l'oocyste libère ces éléments mobiles et haploïdes dans l'hémolymphe du moustique appelés sporozoïtes. Ces sporozoïtes gagnent préférentiellement les glandes salivaires de l'anophèle d'où ils pourront être injectés avec la salive lors d'une piqûre infectante.

Chez le moustique, l'ensemble de ce cycle se déroule en 10 à 40 jours, suivant la température extérieure et les espèces en cause.

➤ Cycle chez l'homme

■ Cycle exo-érythrocytaire:

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infecté injecte dans un capillaire des sporozoïtes. Les sporozoïtes transitent dans la circulation générale et, en quelques minutes, ils envahissent les hépatocytes grâce à une interaction spécifique entre la protéine majeure de surface du sporozoïte et un récepteur spécifique situé sur la membrane plasmique de l'hépatocyte. Le sporozoïte entre alors dans une phase de réplication, au sein de la vacuole parasitophore et de prolifération intracellulaire qui repousse en périphérie le noyau de la cellule et finit par constituer une masse multi-nuclée appelée schizonte qui conduit à la libération de plusieurs dizaines de mérozoïtes dans la circulation. Cette phase de multiplication est asymptomatique et dure de 8 à 15 jours, selon les espèces. Contrairement à *P. vivax*, *P. falciparum* ne possède pas de formes de persistance hépatique ou hypnozoïtes.

■ Cycle intra-érythrocytaire:

Cette phase sanguine est responsable des symptômes qui peuvent être d'intensité variable. Les mérozoïtes libérés lors de la rupture de l'hépatocyte vont débiter le cycle sanguin asexué de prolifération de *P. falciparum* en infectant les érythrocytes.

Les mérozoïtes pénètrent grâce à un processus parasitaire actif et se différencient au sein de la vacuole parasitophore en anneau, puis en trophozoïte, stade à partir duquel une intense phase répliative commence. Il donne alors naissance au schizonte, celui-ci après segmentation montre une forme caractéristique de rosace, puis libère 8 à 32 mérozoïtes qui rapidement réinfectent des érythrocytes sains. L'ensemble de ce cycle dure 48 heures chez *P. falciparum*. L'apparition des gamétocytes a lieu en général la deuxième semaine qui suit l'infection et ces formes peuvent persister plusieurs semaines après la guérison. A la suite d'une nouvelle piqûre, l'anophèle ingère les gamétocytes mâles et femelles [13].

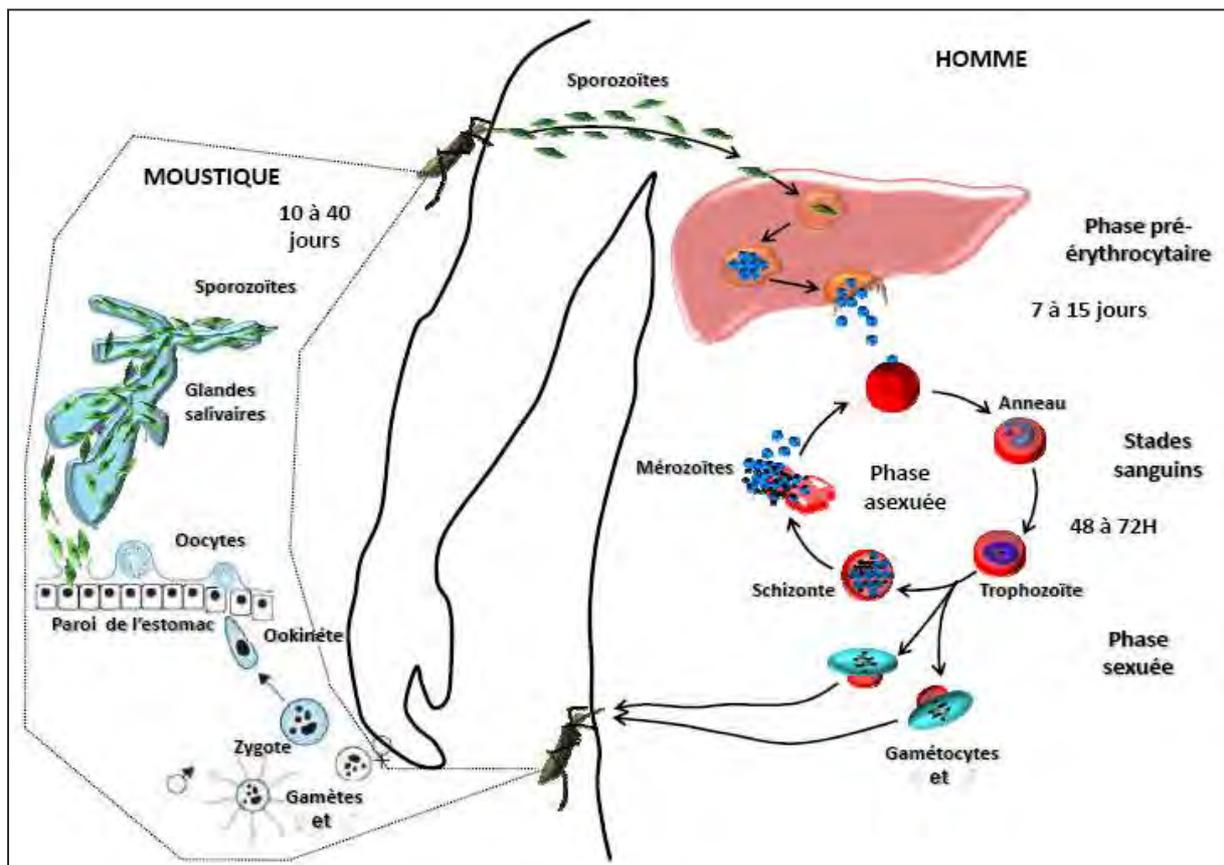


Figure1 : Cycle évolutif du *Plasmodium falciparum* [14] .

IV. PATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR *P. FALCIPARUM*

Elle est très complexe, car la symptomatologie du paludisme est liée au cycle de vie du parasite. En effet, pour toutes les espèces plasmodiales, le cycle exo érythrocytaire, hépatique est sans conséquence apparente et les seules manifestations cliniques s'observent au cours de la multiplication érythrocytaire. Les symptômes et les signes cliniques de la malaria sont provoqués par les formes asexuées des parasites, qui envahissent et détruisent les RBCs, localisés dans les tissus et les organes en liant aux cellules endothéliales (cytoadherence), et induisent le dégagement de beaucoup de cytokines pro-inflammatoires (par exemple facteur de nécrose de tumeur α , TNF α) [7].

IV.1. Accès Palustre simple

Paludisme asymptomatique sans signes de gravité ni éléments d'appréciation (cliniques ou biologiques) permettant d'affirmer un dysfonctionnement des organes vitaux. Sur le plan clinique, la suspicion de paludisme repose donc principalement sur la présence d'un état fébrile ou d'antécédents de fièvre [15] .

On distingue les accès de primo-invasion et les accès de la phase d'état à fièvre périodique. Le tableau clinique des accès de primo-invasion est celui d'un embarras gastrique fébrile associé à des céphalées et des myalgies. Une hépatomégalie peut parfois être retrouvée. Puis va succéder la phase d'état avec une périodicité des accès thermiques. Ces accès palustres sont caractérisés par la succession de 3 phases à rythme régulier : frissons, chaleur et sueur. Dans la réalité, les accès sont souvent moins typiques.

Ces derniers sont extrêmement divers et vont du simple portage asymptomatique aux manifestations graves telles que le coma.

IV.2. Paludisme grave

L'accès pernicleux 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 »[16]. Il regroupe en particulier les formes cliniques du paludisme ayant un risque d'évolution fatale.

Il existe plusieurs formes d'accès palustre grave et des critères de gravité ont été définis en 1990 par l'OMS, puis révisés en 2000 (**Tableau I et II**) [17]. Une cause majeure de décès chez les patients atteints de paludisme à *P. falciparum* est le neuropaludisme. C'est une forme résultant d'une occlusion des microvaisseaux cérébraux par les globules rouges infectés [18].

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

	Précisions du texte de l'OMS
Prostration	Extrême faiblesse
Trouble de la conscience	Adulte: score de Glasgow modifié* < 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

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

Le neuropaludisme se caractérise par des troubles de la conscience (coma calme), des convulsions et des troubles neurologiques (troubles du tonus, troubles cérébelleux...). Des manifestations viscérales peuvent être associées : splénomégalie, hépatomégalie, hypoglycémie, ictère, anémie, œdème aigu du poumon, collapsus, insuffisance rénale fonctionnelle et troubles de la coagulation. Ces accès graves non traités sont mortels, mais correctement traités la mortalité reste cependant élevée. [13].

Dans le paludisme à *P. falciparum*, des facteurs parasitaires comme le PfGPI (glycolipide faisant partie des toxines parasitaires) facilitent le recrutement des macrophages et la libération par ces cellules de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comme IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 etc. (Figure 2) [19]. 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 [20],[21]. Il a été démontré que le taux élevé de TNF- α était corrélé au degré de sévérité du paludisme humain, à la parasitémie et à la mortalité [20],[22]. Cette cytokine induit également la surexpression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales ce qui facilite le phénomène de cytoadhérence précédemment décrit [23].

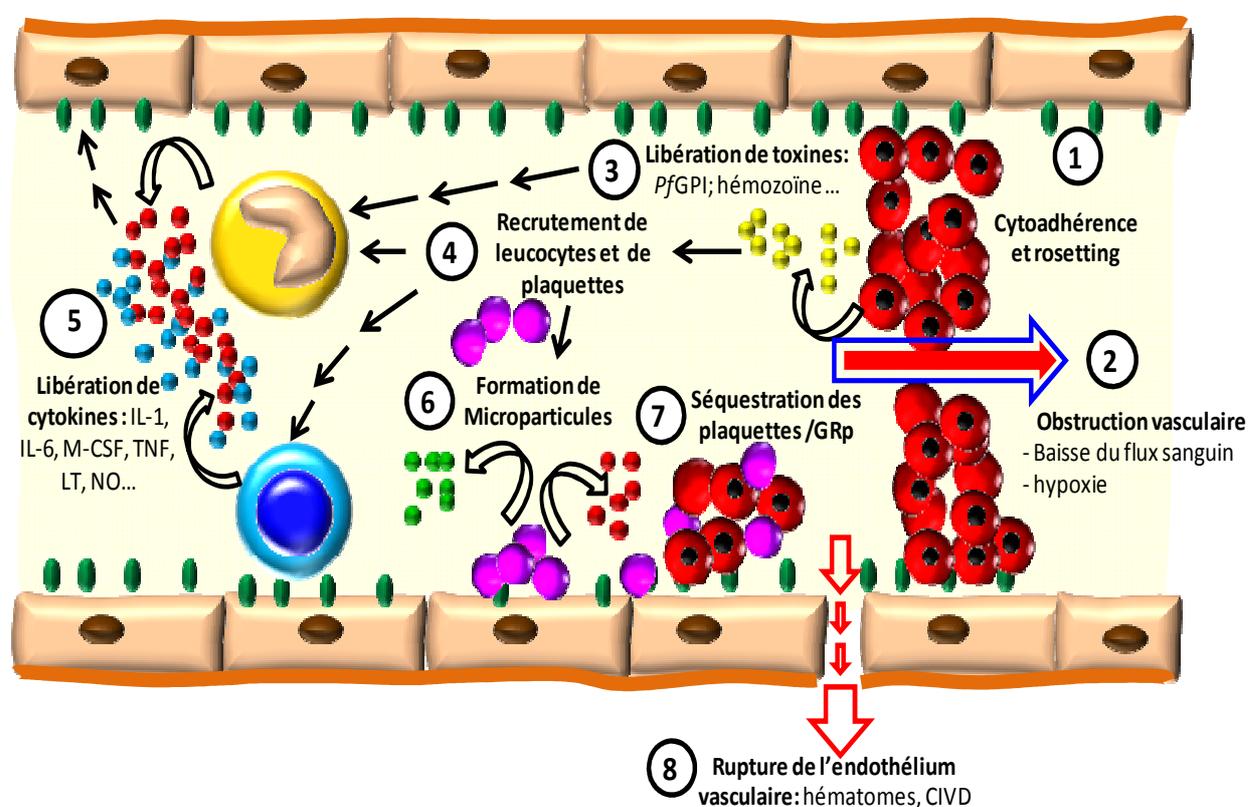


Figure 2 : Physiopathologie du paludisme grave [19]

V. L'IMMUNITÉ ANTI PALUSTRE

La prémunition correspond au maintien d'une infection parasitaire minimale, qui constitue une condition indispensable pour une protection contre l'infection ultérieure. Elle pourrait être liée à l'acquisition d'une immunité antitoxique, ou immunité contre le paludisme maladie, pouvant précéder de plusieurs années l'immunité contre le paludisme infection. Ceci explique qu'un enfant vivant en zone d'endémie peut continuer à avoir des infections plasmodiales, et parfois des parasitémies très élevées en l'absence du moindre signe clinique. Pour expliquer l'apparition d'une symptomatologie et éventuellement sa gravité, on envisage une cascade d'amplification induite par les toxines plasmodiales. Le développement d'anticorps anti-endotoxines module la réponse à l'agression parasitaire [24].

Actuellement, il n'existe aucune preuve que l'immunité stérile fonctionnelle vers le parasite du paludisme est réalisée sur une grande échelle dans les zones d'endémie palustre. Au lieu de cela, les adultes acquièrent un état d'immunité clinique vers une maladie grave, dont ils contrôlent et tolèrent l'infection [25]. Grâce à une réinfection constante, ils peuvent ainsi devenir des porteurs asymptomatiques de stade sanguin asexuée, ainsi que infectieux, gamétocytes-stades sexués [26].

V.1. Immunité innée anti palustre:

L'immunité innée se distingue de l'immunité acquise par le fait qu'elle s'active très rapidement, sans immunisation, sans vaccination préalable. L'immunité innée joue un rôle central dans la lutte contre les infections. Cependant, l'importance de capteurs immunitaires innés dans la détection des parasites intracellulaires, tels que *Plasmodium* spp, a récemment émergé comme un thème central dans le domaine des interactions hôte-pathogène [27].

Les neutrophiles, les mononucléaires phagocytes et les cellules « tueuses naturelles » (Natural killer) généralement appelées cellules NK, sembleraient jouer un rôle prépondérant dans l'immunité innée observée au cours des infections palustres précoces. Certains sporozoïtes restent dans la peau et d'autres se déplacent dans les vaisseaux lymphatiques. Alors que la plupart des parasites lymphatiques sont capturés et dégradés par les cellules dendritiques par un mécanisme encore inconnu [28, 29], certains semblent être en mesure de résister à la dégradation et peut même se développer en putatif petit formes exo-érythrocytaires [28, 30]. Les cellules NK augmentent particulièrement en nombre et sont capables de détruire *in vitro* les globules rouges parasités par *P. falciparum in vitro* [31, 32]; Une très récente étude vient de montrer que les cellules NK provenant du foie sont

capables de détruire les cellules hépatiques parasitées par des sporozoïtes, alors qu'elles sont inaptes à détruire les globules rouges parasités par des trophozoïtes [33].

V.2.Immunité spécifique dans le paludisme

Les réponses immunitaires humorales jouent un rôle important dans l'immunité naturellement acquise au paludisme, mais elles sont lentes à se développer et inefficacement maintenu. Même si cela peut être dû en partie à la nature complexe de *Plasmodium* parasites et le haut degré de variation antigénique, il est prouvé également que le parasite active la fonction des cellules B modifie [26]. L'infection palustre engendre la production par les lymphocytes B de concentrations plasmatiques très élevées d'immunoglobulines (anticorps) non spécifiques du paludisme[34], mais il induit à la fois une production d'immunoglobulines spécifiques et des anticorps

polyclonaux, impliquant une production à prédominance d'IgM et d'IgG. Bien que les anticorps de différents isotopes puissent avoir des fonctions protectrices, les IgG sont à cet effet, les plus performantes [35, 36]. Les anticorps peuvent protéger du paludisme par une variété de mécanisme. Ils peuvent ainsi inhiber l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes [37]. Ils peuvent aussi inhiber la croissance intra érythrocytaire du parasite ou l'augmentation de l'élimination des érythrocytes parasités de la circulation en les fixant à leur surface. Les anticorps préviennent ainsi la séquestration des érythrocytes parasités dans les petits vaisseaux, et favorisent leur élimination par la rate [38, 39]. La réponse des sous-classes d'IgG pourrait aussi être importante pour la fonction des anticorps. Des études en Papouasie-Nouvelle-Guinée chez les enfants, constaté que l'IgG3 contre l'antigène de membrane apicale 1 (AMA1) était fortement associée à la protection contre le paludisme, tandis qu'il y avait seulement une faible association avec IgG1[40], et d'autres études ont également souligné l'importance de la réponse IgG3 dans protection contre le paludisme [41]. Ce constat justifie une enquête plus approfondie, car AMA1 essais vaccinaux montrent IgG1 qui est la sous-classe IgG dominante induite par la vaccination [42].

Parmi les Lymphocyte T, tous n'ont pas la même fonction. Certains sont capables d'interagir avec les Lymphocyte B et les aider à se différencier et produire des anticorps (Ac) ou encore d'interagir avec les cellules phagocytaires et de participer indirectement à la destruction de pathogènes intracellulaires [43, 44].

L'immunité cellulaire joue un rôle primordial dans la protection dirigée contre le développement pré érythrocytaire du *Plasmodium*. Le rôle possible de CD4 et de lymphocytes T CD8 portant la clairance parasitaire in vivo a été étudiée en utilisant *Plasmodium chabaudi*

dans C57BL / 6 en tant que modèle. Des anticorps monoclonaux spécifiques des molécules CD4 et CD8 ont été administrés in vivo pour appauvrir sélectivement le sous-ensemble approprié de cellules T. L'efficacité de l'épuisement a été vérifiée par cytométrie en flux et des études fonctionnelles [45]. Cette immunité est induite à la fois par les sporozoïtes et par le stade suivant, le stade hépatique. Dans les deux cas cependant, la cible est l'hépatocyte, capable de processor et de présenter des antigènes plasmodiaux aux différentes cellules effectrices, les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Pour les cellules T CD8+ qui ont d'importantes fonctions effectrices dans l'immunité pré-érythrocytaire [46], elles contribuent à la protection contre le paludisme sévère [47, 48].

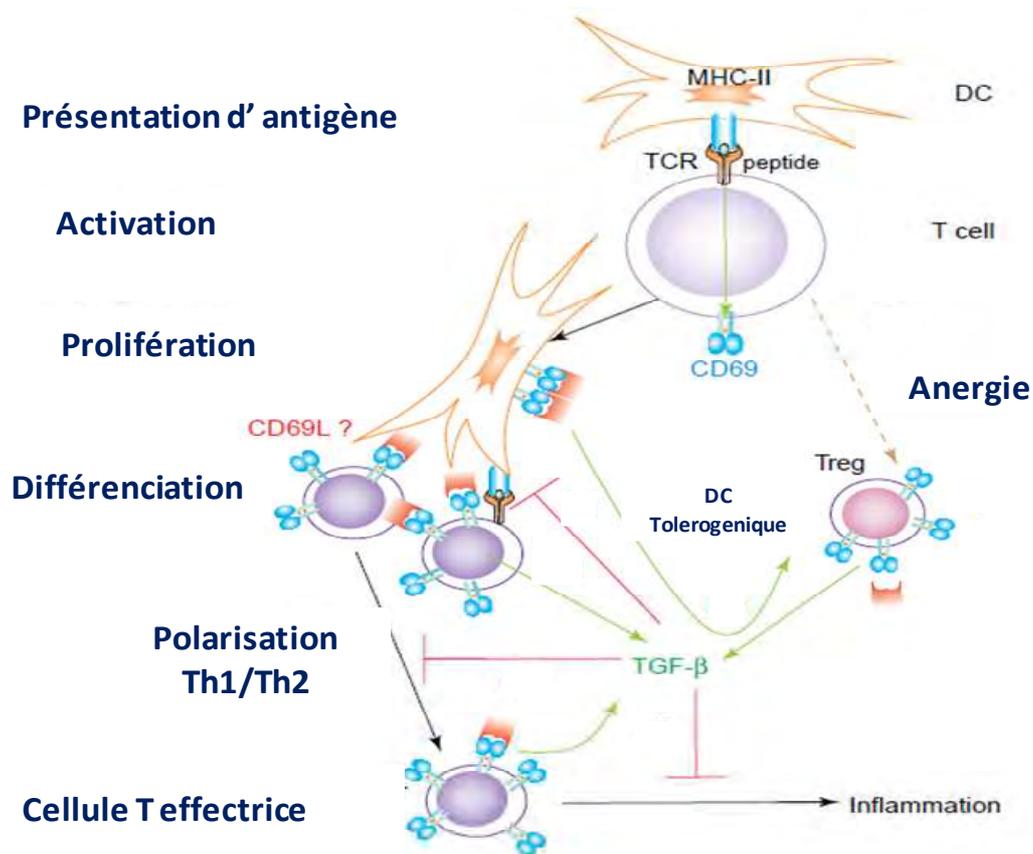


Figure 3 : Interactions hôte-parasite et mécanisme immunologique.[49]

La protection induite est en grande partie le fait de cytokines de type Th-1 telles qu'IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12 et TNF- α , l'inhibition et/ou la destruction du parasite pouvant être la conséquence de mécanismes effecteurs tels que dérivé nitré ou oxygéné, protéines de la phase aiguës. Moins impliqués que les lymphocytes T $\alpha\beta$, les lymphocytes T $\gamma\delta$ contribuent cependant à une immunité de protection contre les stades préérythrocytaires.

VI. HYPOTHESE DE TRAVAIL ET APPROCHE METHODOLOGIQUE

L'activation lymphocytaire est le développement ultérieur de fonctions cellulaires effectrices. Elle sous-tend toutes les facettes de l'immunité adaptative [50]. Très complexe, elle résulte d'une cascade finement régulée d'événements avec comme conséquence l'expression de plusieurs molécules de surface, la production et la sécrétion de cytokines [51]. Les différentes sous populations lymphocytaires partagent de nombreux marqueurs et molécules exprimées par les lymphocytes T en faisant la distinction entre l'expression constitutive et l'expression induite (marqueurs d'activation). On mesure quantitativement le nombre de cellules T exprimant des molécules d'activation comme CD69, CD25, CD71, CD122, HLA-DR ou des molécules de co-stimulation telles que CD28, CTLA-4, CD80, CD86, y compris trois marqueurs de cellules T CD3, CD8 et CD4 [52]. C'est ainsi que l'expression de marqueur membranaire ou de relargage de cytokines par les PBMC stimulées *in vitro* par divers agents d'activation sont très utilisés dans l'évaluation des niveaux d'activation. L'infection palustre est responsable d'une activation lymphocytaire intense et d'une production soutenue de cytokines pro-inflammatoires [53].

Les antigènes d'activation sont des molécules cellulaires dont l'expression peut être induite sur les cellules T, B et NK des lymphocytes. L'antigène CD69 est exprimé positivement au début de 4h après l'activation et initie l'activité des protéines tyrosine kinases [54, 55]. Entre 12-24 h après stimulation, CD25 est exprimé sur la membrane cellulaire pour faciliter la production d'un récepteur IL-2 de haute affinité qui déclenche la prolifération et la différenciation cellulaire [56]. HLA-DR est exprimé entre 48-60 h pour la présentation des antigènes et marque un progrès vers les phases spécifiques et adaptatives de la réponse immunitaire.

Dans cette étude nous avons exploré l'activation précoce et tardive des PBMC de patients souffrant de paludisme clinique par la mesure des pourcentages de cellules T exprimant les deux marqueurs choisis. Cette étude repose sur des constats antérieurement rapportés et concernant l'existence d'une cascade complexe de la réponse immunitaire cellulaire essentiellement de type T. Les patients étudiés étant recrutés dans un service de réanimation pour les cas graves, ils ont tous eu les mêmes chances de survie en raison d'une prise en charge identique et bien conduite. Pour les sujets ayant servi de témoins, l'absence d'une infection plasmodiale et celle de toute infection pouvant interférer sur l'activation lymphocytaire, consolident l'hypothèse selon laquelle toute variation des niveaux d'activation cellulaire par rapport aux cas cliniques ne serait liée qu'au paludisme.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

I. CADRE D'ETUDE :

Il s'agit du Service Réanimation de l'Hôpital Principal de Dakar, où les patients atteints de paludisme grave ont été recrutés. Les services de Médecine et les laboratoires d'analyse du même centre hospitalier ont permis le recrutement des patients atteints d'accès simples et pour les témoins, il s'agit d'individus indemnes de paludisme recruté au LABM de l'Institut Pasteur de Dakar dont ils étaient orientés pour un contrôle de la glycémie. Tous les prélèvements ont été manipulés au niveau de l'Unité d'Immunogénétique de l'Institut Pasteur de Dakar.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Matériels

II.1.1. Matériel du laboratoire :

- Hotte à flux laminaire vertical.....Flufrance®, France)
- Centrifugeuses.....(Jouan® GR412)
- Bain-marie à 37.....(Mettler)
- Incubateur thermostatique fixé à + 37°C (±0,5°C de tolérance)
- Etuve à atmosphère enrichie en CO₂ (37°C + 5% CO₂) (Jouan® GR412)
- Balance de précision(Navigator®)
- Centrifugeuse.....(Jouan® GR412)
- Microscope optique.....(Leica® DMBL)
- Congélateur à -20 °C.....(Goldstar ®)
- Réfrigérateur à -4°C.....(White Westinghouse®)
- Bain Marie(Mettler)
- 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.)
- Pipettes pasteur (5 ml et 10ml)
- Micropipettes (20µl, 200µl, 1000µl).....(GilsonMedicalElectronics® S.A., France)
- Cellules hématimétriques de type COVA
- Embouts stériles sans filtre (200µl et 1000µl)
- FACS Count pour la numération lymphocytaire
- Portoirs pour tubes eppendorf
- Film autocollant

II.1.2.Réactifs :

- Ethanol 70%
- Ficoll
- Bleu Trypan
- RPMI + Pénicilline / Streptomycine
- PBS (1 X)
- PBS (1X) BSA 1%
- PBS (1X) BSA 1% PAF 1%
- SAB découplémenter
- Eau distillée stérile
- Anti-human CD4 APC-conjugated
- Anti-human CD8 PercP -conjugated
- Anti-human CD3 PE/Cy5-conjugated
- Anti-human CD19 APC-conjugated
- Anti-human CD69 FITC -conjugated
- Anti-human HLA-DR- PercP -conjugated
- Mouse IgG1 control FITC-conjugated
- Isotype control IgG2a APC-conjugated
- Mousse IgG1 control PE-conjugated
- Mousse IgG1 control PercP-conjugated

II.1.3.Population d'étude et Matériel biologique

Le recrutement des patients a eu lieu à l'HPD entre 1^{er} Septembre et le 31 Décembre 2013 une période de fortes incidences d'accès palustre. Ce recrutement a reposé sur une étroite collaboration entre les chercheurs et biologistes de l'IPD, les cliniciens et les biologistes de l'HPD. Les patients ont été sélectionnés sur la base des critères de définition élaborés par l'OMS en 2000, concernant les accès cliniques.

Sur l'ensemble des patients colligés, 52 patients ont été sélectionnés pour l'étude. Il s'agit de 12 individus consultant pour un accès palustre simple, 22 patients hospitalisés au service de réanimation pour un accès palustre grave dont 5 patients ayant eu une issue fatale et 18 sujets témoins indemnes du paludisme. La sélection a été effectuée à la suite du consentement éclairé signé par soit les parents directs des patients ou par les patients eux même.

Pour chaque patient, une prise de sang faite sur un tube EDTA et la confection d'une goutte épaisse ou d'un frottis sanguin au moment du recrutement ont permis l'étude des données hématologiques par NFS, l'isolement des PBMCs et l'appréciation de la densité parasitaire.

II.2. Méthodologie

II.2.1. La séparation cellulaire par gradient de Ficoll :

II.2.1.1. Principe

Les éléments figurés du sang, en milieu Ficoll de haute densité, subissent durant la centrifugation une migration différentielle qui conduit à leur séparation en deux fractions : d'une part, les érythrocytes et les granulocytes qui sédimentent au fond du tube et d'autre part, les lymphocytes, les monocytes et les plaquettes qui restent à l'interface échantillon/milieu de séparation.

II.2.1.2. Mode opératoire

Il faut préciser que ce travail a été fait de façon stérile sous la hotte à flux laminaire. Déposer lentement le sang total (2,5 à 5 ml) au dessus de 4 ml de Ficoll 1077 contenus dans un tube conique Falcon de 15 ml :

- éviter de mélanger les deux solutions puis Centrifuger à 1500 rpm pendant 30 min à 20°C de manière à séparer les cellules mononuclées (PBMC, interface RPMI-Ficoll) des PNN (interface – GR).
- Collecter l'interface des PBMC après avoir enlevé le PBS ou RPMI et transférer les cellules dans un nouveau tube de 15 ml, Compléter le volume jusqu'à 15 ml avec la solution de lavage RPMI/ PS/ L.glu et centrifuger 1500 rpm pendant 30 min à 20°C (2 fois).
- Reprendre le culot de cellules dans 2 ml de RPMI/ PS/ L.glu
- Faire une dilution au 1/10 de la suspension cellulaire dans du bleu trypan filtré en mettant 20 µl de la suspension cellulaire dans un puits d'une plaque ELISA de 96 puits contenant 180 µl de bleu trypan puis vortexer le mélange obtenu avant de prendre 10 à 20 µl pour remplir une cellule Kova-Glasstic® Slides de 10 puits compter les cellules vivantes (fluorescentes) au microscope optique X 40 :

Pour déterminer le nombre de cellules il faut multiplier la concentration cellulaire obtenue selon le tableau 1 (nombre de cellules par µl) par 2.10^4 soit :

- 10 c'est-à-dire l'inverse de la dilution avec le bleu trypan
- 10^3 pour avoir le nombre de cellules par ml (1000 μ l) de suspension
- 2 pour avoir le nombre total de cellules dans les 2 ml de suspension.

C'est à partir de cette suspension qu'est réalisé le technique de marquage cellulaire et s'il reste des cellules /ml, on les conserve a -180°C .

II.2.2. Marquage cellulaire

Préparer 4 tubes de cytométrie pour chaque échantillon. Ajuster à $1 \cdot 10^6$ cellules/100 μ l, puis prendre 50 μ l de suspension de cellules par tube, soit 500 000 cellules. Ajouter 5 μ l de SAB dé complémenté pour bloquer les sites non spécifiques, incuber pendant 15 min à 4°C . Ajouter :

- 10 μ l de PBS 1X dans le tube 1 (BLANC)
- 10 μ l de mixte isotype dans le tube 2 (ISOTYPE)
- 10 μ l de mixte 1 dans le tube 3 (CD3-PE, CD4-APC, CD8-PercP et CD69-FITC)
- 10 μ l de mixte 2 dans le tube 4 (CD3-PE, CD19-APC, CD69-FITC et HLA-DR-PercP)

Vortexer puis incuber pendant 30 minutes sur la glace à 4°C et à l'abri de la lumière ; laver 2 fois avec 500 μ l de PBS 1X – BSA 1% ; verser le surnageant puis récupérer le culot dans 300 μ l de solution de fixation (PBS 1X – BSA 1% - PAF 1%) ; incuber pendant 15 à 20 min à la Température ambiante à l'abri de la lumière puis centrifuger à 1800 rpm pendant 5 min ; verser le surnageant et reprendre le culot dans 1 ml de PBS 1X et acquisition au Cytométrie en flux.

II.2.3. Technique de cytométrie en flux :

La cytométrie en flux ou FACS (Fluorescence Activated Cell-Sorting) est une technique d'analyse paramétrique (tailles, granularités...) sur des cellules isolées à partir d'une suspension de populations cellulaires hétérogènes, entraînées rapidement dans une gaine liquide et amenées une par une dans un faisceau laser [57].

II.2.4. Acquisition et Analyse des données

Le cytométrie en flux ayant permis l'acquisition de nos cellules étudiées est le FACS Calibur[®]. Il est géré par le logiciel Cell Quest Pro[®] et les données recueillies ont été analysées par le logiciel FlowJo[®] 10.0.6. Cette procédure a permis d'abord la confection de plots parmi lesquels l'exemple représenté sur la **figure 3** ; puis la détermination des proportions de cellules T/CD4 et CD8 exprimant les marqueurs membranaires CD69 et HLA-DR.



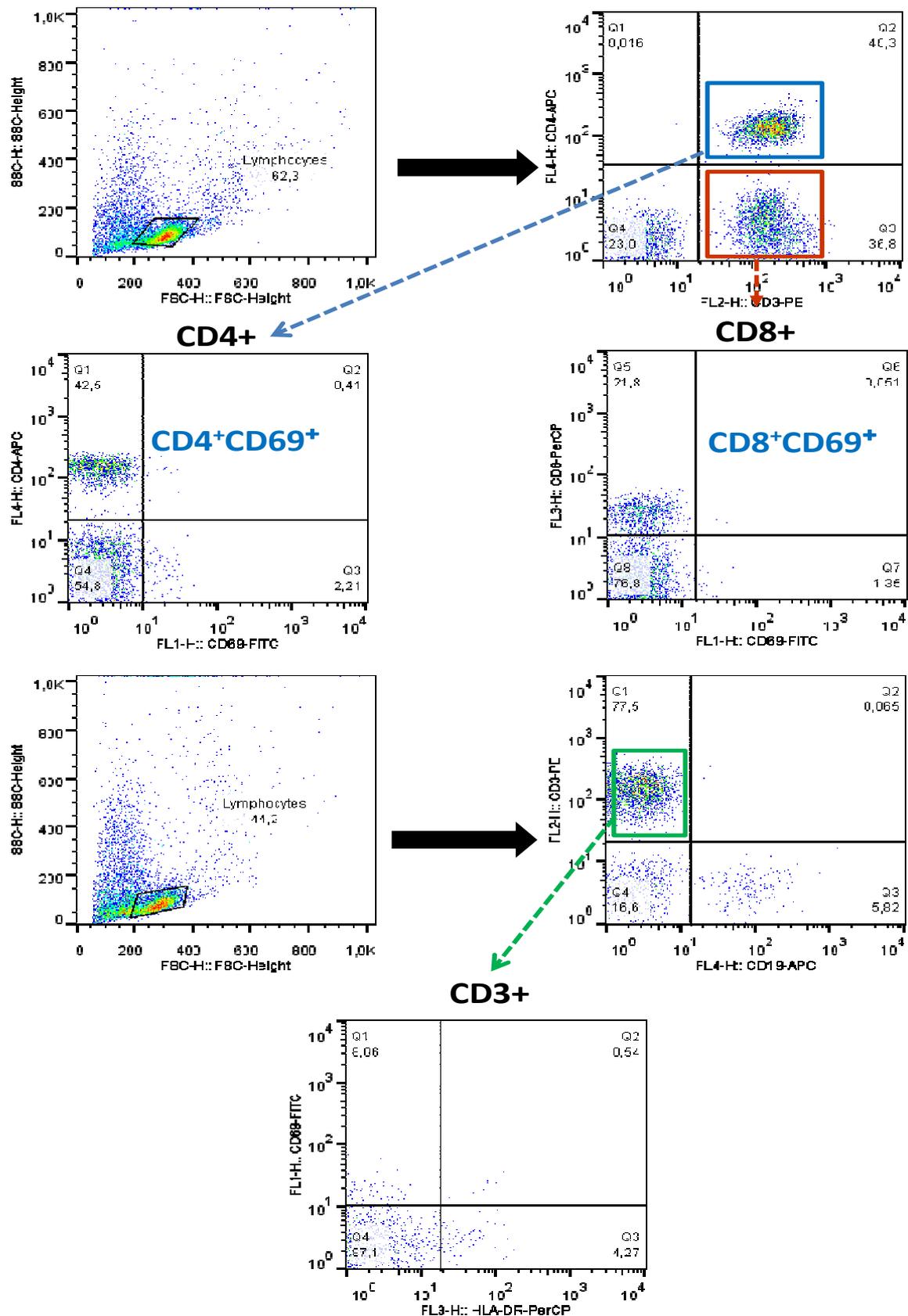


Figure 4 : Procédures de détermination des proportions de lymphocytes avec le logiciel Flow Jo

II.2.5. Analyse statistique des données

Elle a été réalisée avec le logiciel STATVIEW[®] version 5.1. Les tests non paramétriques de Mann Whitney et de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour les comparaisons statistiques de pourcentage d'expression de CD69 et HLA-DR pour les lymphocytes. La recherche de corrélation a été faite par le test des rangs de Spearman.

Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

III. RESULTATS

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

Les données sont résumées au niveau du **Tableau III**. La comparaison des paramètres suivant la gravité montre des variations significatives des taux de globules blancs, de plaquettes et de l'hématocrite. En effet, chez les patients souffrant de paludisme grave, on observe une augmentation des globules blancs liée surtout à celle des polynucléaires neutrophiles et des taux de plaquettes inférieurs à ceux des patients consultant pour un accès palustre simple ($P < 0,05$). L'hématocrite et les taux de globules rouges sont plus élevés dans les cas de paludisme non aggravé.

Tableau III : Caractéristiques épidémiologiques et clinico-biologiques des cas et des témoins à l'inclusion.

Caractéristiques	Accès palustres				Témoins
	Grave	P*	Simple	P**	Non infectés
Effectifs (N)	22		12		18
Sexe M/F	16/5		7/5		12/6
Age moyen (ans)	38 ,09 (15 - 80)	0,001	17 (5 - 33)	0,0008	31,06 (23 - 50)
Hémoglobine (g/100ml)	10,94(6,7 - 15,9)	ns	13,1 (11,3 - 15,7)	ns	14,20 (11,3 - 16,5)
Hématocrite (%)	30,88 (19,2 - 43,7)	0,032	38,77 (32,5 - 46,3)	0,05	42,08 (33,6 - 48,3)
Globulesrouge (million/ μ l)	3 ,23 (2,2 - 4,48)	0,04	4,59 (4,02 - 5,41)	ns	5,03 (4,16 - 5,78)
Globules blancs (μ l)	10,29 (4,79 - 29,22)	0,04	6,74 (4,2 - 11,3)	0,001	5,58 (3,7 - 8,8)
Plaquettes (Giga/l)	93,35 (12 – 375)	0,008	157,71 (80 -239)	ns	260 (202 – 321)
Basophiles (Giga/l)	0,07 (0 – 0,2)	ns	0,08 (0,02 – 0,17)	ns	0,05 (0 – 0,1)
Neutrophiles (Giga/l)	9,09 (4,6 - 13,54)	0,08	4,58 (1,94 – 8,73)	0,03	2,54 (1.47 – 4.51)
Eosinophiles (Giga/l)	0,02 (0,01 – 0,02)	0,04	0,15 (0,02 – 0,33)	ns	0,31 (0.02 – 0.79)
Lymphocytes (Giga/l)	-	ns	1,35 (0,62 – 1,88)	ns	2,26 (1,51 – 3,8)
Monocytes (Giga/l)	-	ns	0,59 (0,07 – 1,1)	ns	0,38 (0,09 – 0,89)
Parasitémie (P/ μ l)	30814,08 (40 – 324000)	ns	4812,62 (80 – 24652)	ns	-

P* = Test de Mann-Whitney, comparaison accès graves *versus* paludisme simple et témoins

P** = Test de Mann-Whitney, comparaison paludisme simple *versus* témoins

ns = différence non significatif ($P > 0,05$)

Les comparaisons faites entre les témoins indemnes de paludisme et les patients souffrant de paludisme simple permettent de constater des neutrophiles plus nombreux en moyenne chez les malades ($P < 0,05$).

III.2. Variations des niveaux d'activation lymphocytaire T

III.2.1- Comparaisons des proportions de cellules T activées entre les malades et les témoins

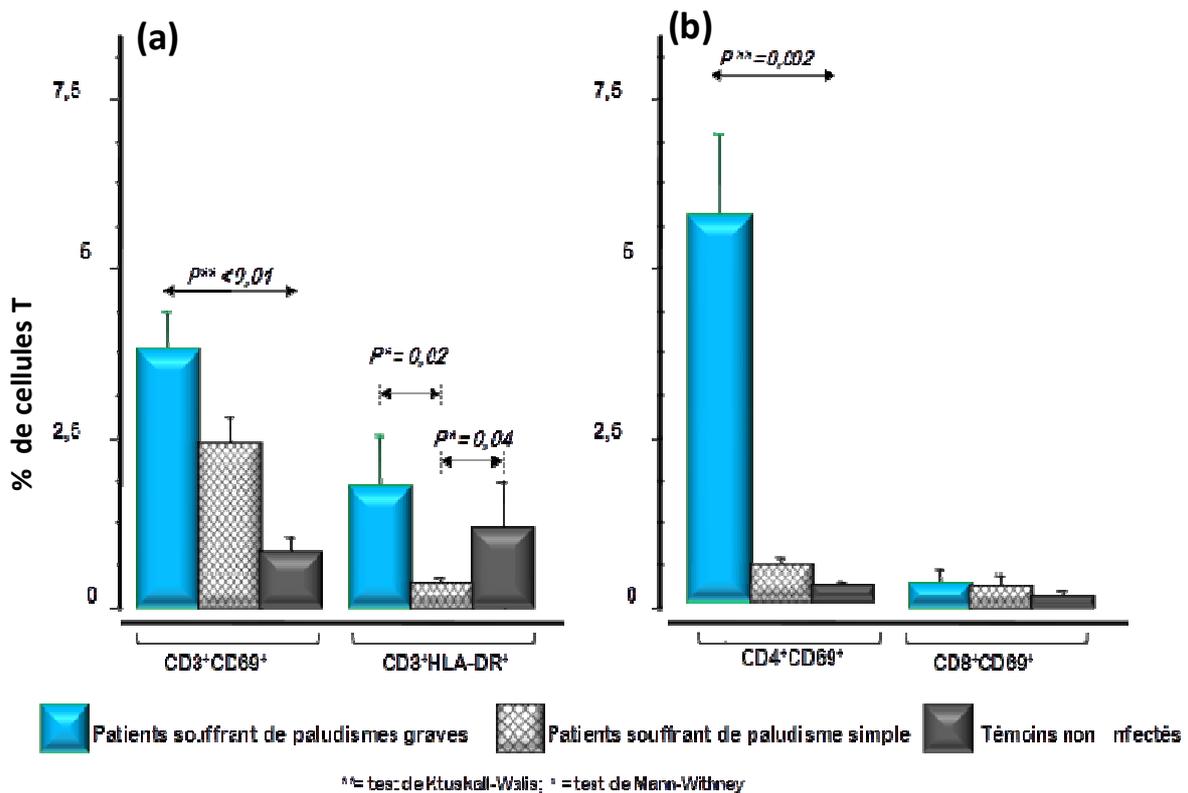


Figure 5 : Variations des niveaux d'activation suivant la gravité des accès et chez les témoins

L'étude de la variation des niveaux d'activation lymphocytaire T selon la gravité (entre paludisme grave et paludisme simple) et chez les individus non-infectés montre une différence significative de l'expression du marqueur CD69 par les cellules CD3 ($P < 0,01$) (**Figure 5a**). Parmi les sous groupes de cellules T CD3, ce marqueur précoce de l'activation cellulaire (CD69) est surtout retrouvé à la surface des lymphocytes T CD4⁺ avec un pourcentage d'environ 5% chez les patients hospitalisés pour un paludisme compliqué (**Figure 5b**) ($P = 0,002$). Pour les cellules TCD8⁺CD69⁺, leurs proportions ne varient pas significativement suivant les trois groupes de personnes étudiées (**Figure 5b**)

Concernant l'expression de HLA-DR, considéré comme un marqueur tardif de l'activation lymphocytaire T, les taux sont plus importants dans le paludisme grave que chez les accès simples ($P = 0,02$) dont les cellules T expriment moins ce marqueur que celles des témoins sans paludisme ($P = 0,04$) (**Figure 5a**).

III.2.2. Comparaisons des proportions de cellules T activées suivant l'issue du paludisme sévère

Il s'agit d'une analyse comparative des niveaux d'activation lymphocytaire suivant l'issue du paludisme de réanimation (décédés *versus* survivants). Les histogrammes des **Figures 6a et 6b** matérialisent cette comparaison des niveaux d'expression des marqueurs membranaires CD69 et HLA-DR des lymphocytes par les TCD3⁺, les TCD3⁺CD4⁺ et TCD3⁺CD8⁺.

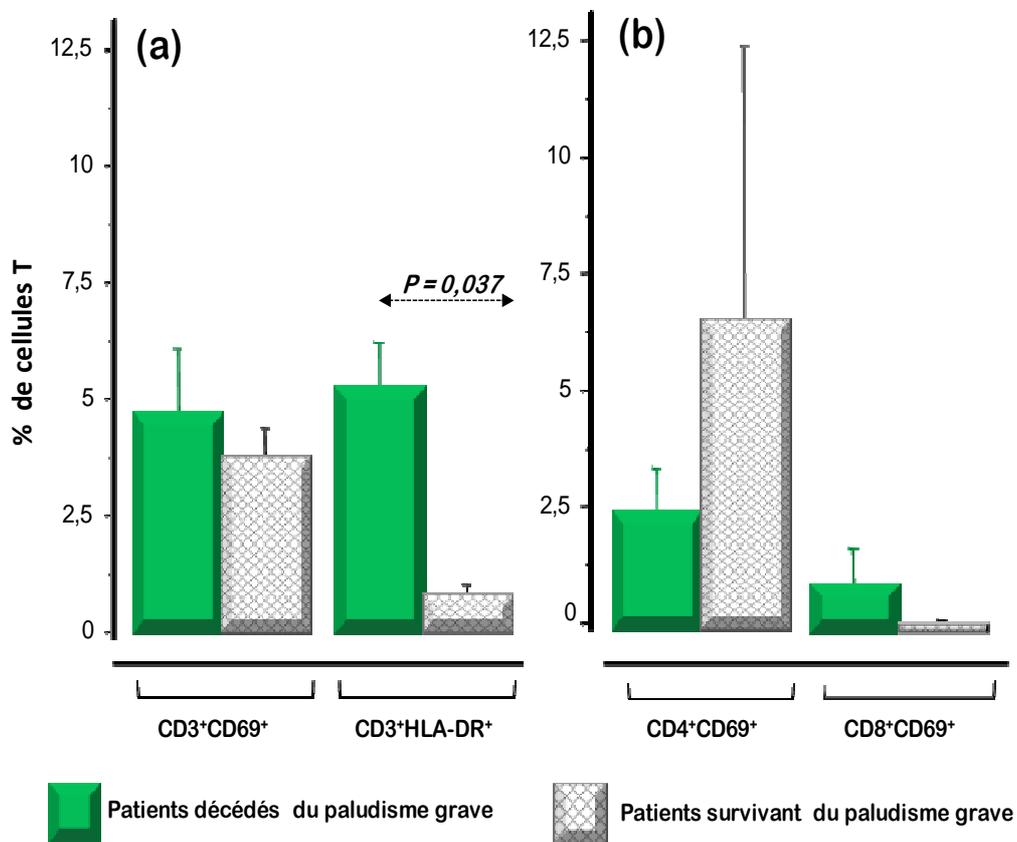


Figure 6 : Comparaisons des proportions de cellules T activées suivant l'issue des accès grave

Pour le marqueur d'activation CD69 aucune variation statistiquement significative n'a été notée chez les survivants et les décédés. Seuls les niveaux d'expression de HLA-DR par les lymphocytes T CD3⁺ est discriminante suivant l'issue des patients atteints de paludisme grave, avec des taux plus élevés chez les patients à issue fatale ($P = 0,034$) (**Figure 6a**).

III.3. Interrelations entre les niveaux d'activation cellulaire dans la population d'étude

Pour les marqueurs d'activation lymphocytaire CD69 et HLA-DR, nous avons jugé nécessaire d'évaluer les interrelations entre leurs niveaux d'expression à la surface des différentes cellules étudiées. Pour effectuer ce type d'analyse, nous avons recherché des corrélations pour les lymphocytes TCD3⁺, les TCD3⁺CD4⁺ et TCD3⁺CD8⁺ en tenant compte de la gravité des accès palustres c'est-à-dire aussi bien dans les accès graves (**Tableau IV**) que dans le paludisme simple (**Tableau V**).

Tableau IV: Interrelations entre le niveau d'activation cellulaire dans le paludisme grave

	CD3 ⁺ HLADR ⁺	CD3 ⁺ CD69 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺
CD3 ⁺ CD69 ⁺	<i>Rho</i> = 0,67 <i>P</i> = 0,002		
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	<i>Rho</i> = 0,19 <i>P</i> = 0,38	<i>Rho</i> = 0,19 <i>P</i> = 0,38	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	<i>Rho</i> = 0,50 <i>P</i> = 0,02	<i>Rho</i> = 0,73 <i>P</i> = 0,001	<i>Rho</i> = 0,29 <i>P</i> = 0,182

Tableau V : Interrelations entre le niveau d'activation cellulaire dans le paludisme simple

	CD3 ⁺ HLADR ⁺	CD3 ⁺ CD69 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺
CD3 ⁺ CD69 ⁺	<i>Rho</i> = - 0,01 <i>P</i> = 0,95		
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	<i>Rho</i> = 0,27 <i>P</i> = 0,90	<i>Rho</i> = - 0,05 <i>P</i> = 0,84	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	<i>Rho</i> = - 0,03 <i>P</i> = 0,80	<i>Rho</i> = 0,59 <i>P</i> = 0,05	<i>Rho</i> = 0,04 <i>P</i> = 0,99

Dans le paludisme grave ou simple de recrutement hospitalier, il existe une forte corrélation positive entre l'expression de CD69 par les cellules TCD3⁺ et celle des lymphocytes TCD8⁺

($P = 0,01$; $Rho = 0,73$). C'est uniquement dans les cas de paludisme grave que l'expression de HLA-DR par les cellules T CD3+ apparait associée à celle de CD69 chez les mêmes cellules T ($P = 0,002$; $Rho = 0,67$). Pour les cellules TCD8+, les niveaux d'expression de CD69 sont corrélés à ceux du même marqueur chez l'ensemble des lymphocytes T CD3+ dans les accès sévères (Tableau IV).

III.4. Variations suivant les données hématoparasitologiques

III.4.1. Comparaison suivant les densités parasitaires

Sur la base du seuil parasitémiq ue de 0,04%, nous avons réparti les patients en deux groupes: (i) des patients ayant une parasitémie inférieure à 0,04% et (ii) des patients avec une parasitémie $\geq 0,04\%$. La comparaison des niveaux d'activation lymphocytaire T dans les différents types d'accès palustres simples ou graves, est schématisée au niveau des histogrammes de la **Figure 7** avec les **Figures 7a et 7b** pour les patients à paludisme grave et les **Figures 7c et d** pour le paludisme simple.

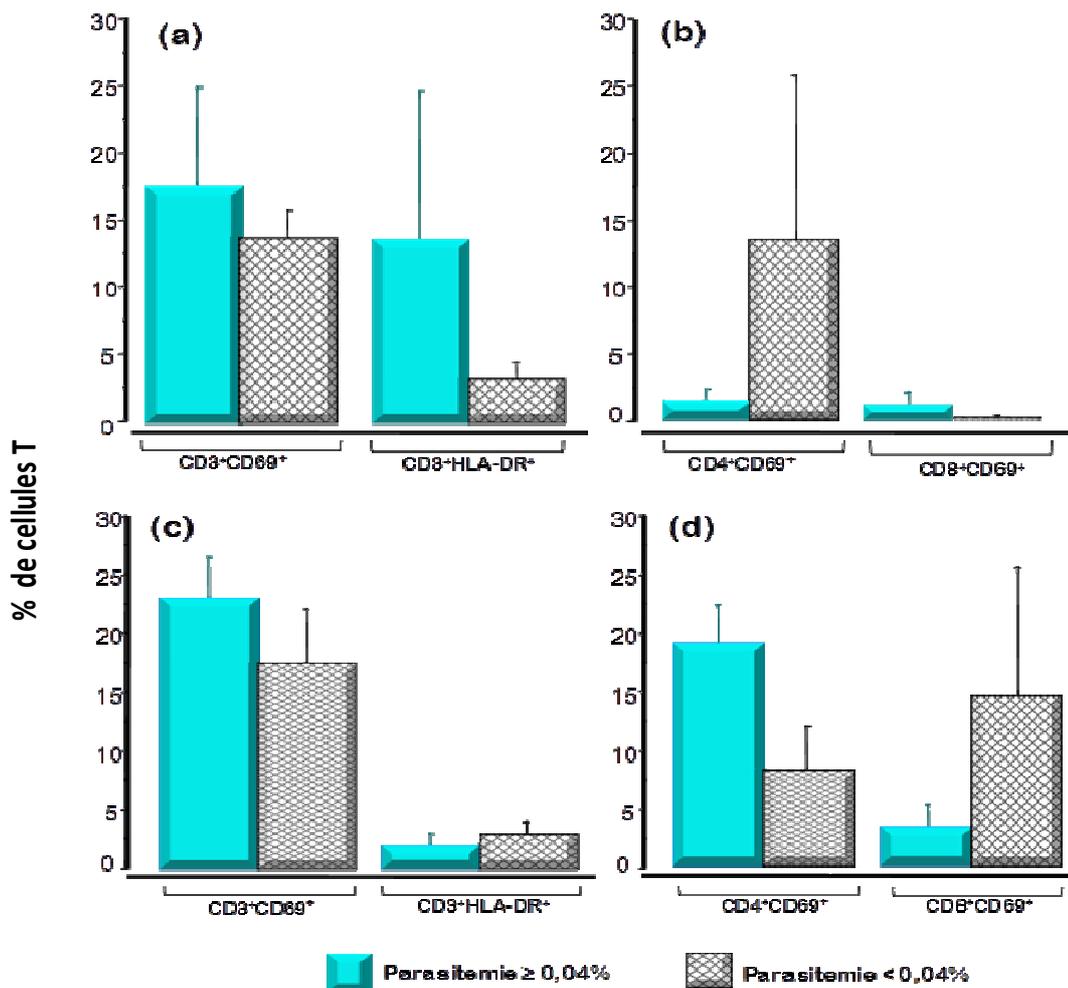


Figure 7 : Variations des niveaux d'activations cellulaires suivant la parasitémie dans les deux types d'accès : (a et b) paludisme grave et (c et d) paludisme simple.

Dans le paludisme sévère les variations des niveaux d'expression de CD69 par les lymphocytes TCD3⁺ évoluent dans le même sens que celle des cellules CD3⁺CD8⁺ alors que dans les accès simples ce sont les CD3⁺CD4⁺ qui semblent évoluer dans la même direction que les lymphocytes TCD3⁺. En outre il existe une tendance importante concernant les cellules T CD3⁺CD69⁺ et T CD3⁺HLA DR⁺ qui sont plus retrouvées chez les patients accès grave de densités parasitaires supérieures à 0,04%. Ces variations n'est pas cependant significative du point de vue statistique.

III.4.2. Interrelations entre les niveaux d'activation cellulaire et les plaquettes suivant les types d'accès.

Pour déceler une probable participation des cellules T exprimant les marqueurs de surface CD69 et HLA-DR, à la baisse des taux de plaquettes, nous avons recherché des corrélations entre les niveaux d'activation cellulaire en tenant compte de la gravité du paludisme hospitalier **tableau VI**.

Tableau VI : Interrelations entre les niveaux d'activation cellulaire et le taux de plaquettes

		Paludisme grave plaquettes	Paludisme simple plaquettes	Témoins plaquettes
CD3⁺CD69⁺	<i>Rho</i>	-0,31	-0,14	-0,54
	<i>P</i>	0,21	0,72	0,03
CD3⁺HLADR⁺	<i>Rho</i>	-0,39	0,31	0,31
	<i>P</i>	0,12	0,45	0,22
CD4⁺CD69⁺	<i>Rho</i>	-0,4	0,02	-0,44
	<i>P</i>	0,05	0,96	0,09
CD8⁺CD69⁺	<i>Rho</i>	0,005	0,39	-0,16
	<i>P</i>	0,90	0,36	0,39

Il existe des corrélations négatives entre les cellules T CD3CD69 et les plaquettes chez les témoins indemne du paludisme (P= -0,54 ; Rho= 0,03), la même chose est obtenue chez les patients des accès grave entre les cellules T CD4CD69 et le taux des plaquettes. Aucune corrélation n'a été décelée chez les patients atteints de paludisme simple (**Tableau IV**).

DISCUSSION

Ce travail a pour but d'évaluer les niveaux d'activation lymphocytaire T du sang périphérique par la recherche des marqueurs membranaires CD69 et HLA-DR dans le paludisme de recrutement hospitalier. Cette approche a nécessité un recrutement de patients souffrant de paludisme grave ou d'un accès simple à l'Hôpital Principal de Dakar et des témoins indemnes du paludisme. Tous les échantillons ont été manipulés au niveau de l'Unité d'Immunogénétique de l'Institut Pasteur de Dakar.

Notre discussion s'articulera d'abord sur les points méthodologiques, les caractéristiques clinico-biologiques discriminantes de la population d'étude et les données relatives à l'évaluation des niveaux d'activation lymphocytaire T suivant la gravité et l'issue des accès.

❖ Méthodologie

Concernant le choix des patients, les critères de sélection des cas cliniques simples et graves, ont été établis sur la base des définitions élaborées par l'OMS [17]. Cette option repose sur le fait que toute étude affairant au paludisme et surtout aux cas sévères, doit être basée sur une bonne sélection des patients face à la variabilité clinico-biologique de la maladie. Nous avons choisi comme base de recrutement la définition du paludisme de réanimation élaborée par **Saissy et al.** [58] à partir des critères de gravité définis par l'OMS en 2000 [17].

Reconnu comme un centre de référence dans la prise en charge du paludisme grave, au niveau de la sous région, le service de réanimation de l'HPD a été choisi pour le recrutement des patients avec un accès sévère. Pour éviter des biais de recrutement, les cas de paludisme simples ont été également collectés au niveau des Services de médecine de l'HPD. Le choix de l'HPD s'explique d'abord par la qualité de la prise en charge des patients mais également par l'accessibilité géographique et l'existence d'une collaboration avec l'Unité d'Immunogénétique de l'IPD depuis 1991.

Pour les patients souffrant de paludisme simple nous avons tenu compte du milieu urbain, le paludisme a une transmission plus faible due à de nombreux facteurs, mais cette transmission s'avère également être hétérogène [59]. Dans ce milieu les patients ont plus facilement accès aux soins ce qui facilite la prise en charge et le recrutement.

Le groupe témoin a été recruté au LABM de l'Institut Pasteur de Dakar, il s'agit d'individus orientés à l'IPD pour un contrôle de la glycémie et ayant sur le résultat négatif de la goutte épaisse et TDR.

Les techniques d'évaluation de l'activation lymphocytaires sont nombreuses on note parmi elles le marquage extracellulaire révélé au cytométrie en flux, technique que nous avons utilisé. Il s'agit d'une méthode de référence largement décrite antérieurement.

Ses avantages par rapport aux autres méthodes comme l'ELISPOT sont entre autres la possibilité de traiter des cellules individuelles, la spécifique et les analyses multiparamétriques [57].

Concernant les marqueurs d'activation choisis CD69 et HLA-DR, ont été rapportés dans les études d'activation lymphocytaire T dans les maladies inflammatoires[60] et des infections bactériennes[52]. La molécule CD69 est reconnue comme un marqueur d'activation précoce des lymphocytes T, B et NK. Elle apparait dans les 4h qui suivent l'activation. Molécule du HLA de classe II, le marqueur HLA-DR n'est exprimé à la surface des cellules T qu'à la suite d'une activation. Il s'agit d'un marqueur d'activation tardive présente 48 à 60 heures après l'activation [54, 55].

❖ **Caractéristiques clinico-biologiques des patients**

S'agissant de l'analyse des caractéristiques clinico-biologiques de patients étudiés, nous avons retrouvé des variations significatives de l'hématocrite et du taux des leucocytes suivant la gravité. 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 [61] en raison surtout du rôle joué par les plaquettes dans la pathogénèse du paludisme. Par contre, en tenant compte des polynucléaires basophiles et éosinophiles, nous remarquons que leur taux est plus faible dans les cas du paludisme grave, que dans le paludisme simple. L'hyperleucocytose observée dans ce cas est du type neutrophile [62].

❖ **Niveaux d'activation lymphocytaire**

Notre étude a montré des variations significatives des niveaux d'activation lymphocytaires TCD3 plus élevés chez les patients atteints de paludisme grave ceci quel que soit le marqueur choisi. Pour le marqueur CD69, l'analyse montre qu'il est plus présent à la surface des lymphocytes T CD4⁺ que sur celle des TCD8⁺. Dans des études antérieures portant sur la production *in vitro* des cytokines ont démontré la présence d'une stimulation de ces cellules T CD4 Th1 et Th2 [63] et leur implication dans la physiopathologie du paludisme grave **Coltel, Combes et al. 2004**). En outre une étude similaire à la nôtre portant sur l'évaluation de niveaux d'expression de HLADR par lymphocytes T dans une infection palustre à *P. falciparum*, nous permet de confirmer certain de nos résultats à savoir la différence significative observée suivant la gravité et l'issue des accès [53, 64]

Des résultats récents indiquent que CD69 module la synthèse de molécules immunorégulatrices. Les cellules T initialement activées par l'antigène spécifique démarrent un processus de prolifération en exprimant la molécule CD69 [65].

L'expression de la molécule HLA-DR influencerait la production d'anticorps du stade pré-érythrocytaire et érythrocytaire des antigènes du paludisme d'où l'importance de doser les Ac [66].

Dans notre étude l'utilisation d'un marqueur d'activation précoce (CD69) associé à un marqueur d'activation tardive (HLA-DR) a permis de confirmer l'existence d'une stimulation continue des cellules T dans le paludisme de réanimation. En effet la corrélation observée entre les proportions de cellules TCD3⁺CD69⁺ et celles des lymphocytes T CD3⁺HLA-DR⁺ démontre la complexité de la physiopathologie des accès graves qui résulte d'une cascade spécifique dans l'immunité innée et adaptative. Par contre seul les cellules TCD3⁺CD69⁺ a été stimulé et aucune stimulation des cellules TCD3 exprimant HLA-DR dans le cas de paludisme simple. Notre étude l'utilisation d'un marqueur d'activation précoce (CD69) associé à un marqueur d'activation tardive (HLA-DR) a permis de confirmer l'existence d'une stimulation continue des cellules T dans le paludisme de réanimation. En effet la corrélation observée entre les proportions de cellules TCD3⁺CD69⁺ et celles des lymphocytes T CD3⁺HLA-DR⁺ démontre de la complexité physiopathologique des accès graves en terme d'activation lymphocytaire. En effet, selon certains auteurs les formes graves résulteraient d'une cascade complexe d'événements incluant probablement un défaut quantitatif et/ou qualitatif des réponses Ac et cellulaires protectrices surtout dirigées contre le parasite [61].

Nos résultats ont montré des corrélations négatives entre le taux de plaquettes et les cellules T CD4⁺CD69⁺ chez les patients souffrant de paludisme grave. Ce résultat démontre l'implication des cellules TCD4⁺ activées dans les mécanismes physiopathologiques conduisant aux thrombopénies plus fréquentes dans le paludisme grave; largement rapporté [61]. Il n'existe aucune corrélation entre les cellules exprimant HLA-DR et les plaquettes suivant les types d'accès.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a été réalisé avec une population d'étude comprenant trois groupes dont des patients atteints de paludisme « simple », de paludisme grave et des témoins non infectés. Nous avons étudié les niveaux d'activation lymphocytaire T exprimés à la surface des marqueurs membranaires dans le paludisme à *P. falciparum*. Il s'agit des marqueurs d'activations lymphocytaires précoce et tardive respectivement le CD69 et HLA-DR.

L'étude a permis de mettre en évidence l'existence d'une activation précoce et tardive des cellules T CD3⁺ dans le paludisme sévère. Il s'agit ainsi d'une activation continue des cellules T qui ne se retrouve pas dans les cas d'accès simples et chez les sujets normaux.

Toutefois, l'évaluation de la fonctionnalité des autres groupes lymphocytaire B et NK ainsi que les cytokines pro-inflammatoires et le dosage des anticorps pourraient compléter ce type de travail.

Ces travaux devront être poursuivis en augmentant la cohorte aussi bien chez les cas graves (selon l'issue) que chez les patients atteints d'accès palustre simple en vue d'un meilleur marqueur à visé pronostique et biologique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS, *le paludisme dans le monde*. WORLD MALARIA REPORT 2013, 2013.
2. Andrade, B.B. and M. Barral-Netto, *Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011. 106 Suppl 1: p. 70-8.
3. Singh, B., et al., *A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings*. Lancet, 2004. 363(9414): p. 1017-24.
4. Miller, L.H., M.F. Good, and G. Milon, *Malaria pathogenesis*. Science, 1994. 264(5167): p. 1878-83.
5. Maxwell, C.A., et al., *Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania*. Trop Med Int Health, 2002. 7(12): p. 1003-8.
6. Carne, B., *Facteurs de gravité du paludisme en Afrique sub-Saharienne. Aspects épidémiologiques*. Med Mal Infect. , 1995. 25: p. 815-822.
7. Pasvol, G., *Management of severe malaria: interventions and controversies*. Infect Dis Clin North Am, 2005. 19(1): p. 211-40.
8. Chin, W., et al., *A Naturally Acquired Quotidian-Type Malaria in Man Transferable to Monkeys*. Science, 1965. 149(3686): p. 865.
9. Fontenille, D., et al., *[Malaria vectors: from the field to genetics. Research in Africa]*. Rev Epidemiol Sante Publique, 2005. 53(3): p. 283-90.
10. PNLP, *Plan strategique national 2011-2015*. MINISTERE DE LA SANTE

ET DE LA PREVENTION. REPUBLIQUE DU SENEGAL, 2010.

11. Camara, B., et al., *[Malaria severity criteria and prognostic factors among children in Dakar]*. Med Mal Infect, 2011. 41(2): p. 63-7.
12. McCutchan, T.F., R.C. Piper, and M.T. Makler, *Use of malaria rapid diagnostic test to identify Plasmodium knowlesi infection*. Emerg Infect Dis, 2008. 14(11): p. 1750-2.
13. BRENIER-PINCHART., M.-P. and H. PELLOUX, *Paludisme*. Corpus Médical, 2002: p. 99.
14. White, N.J., et al., *Malaria*. Lancet, 2013.
15. OMS, *Directives pour le traitement du paludisme* Deuxième édition 2011.
16. Saissy, J., *Paludisme grave*. Encyclopédie Médico-Chirurgicale 2001. 36-984-B-10:1-12.
17. WHO, *Severe falciparum malaria*. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000. 94: p. 90.
18. Miller, L.H., et al., *The pathogenic basis of malaria*. Nature, 2002. 415(6872): p. 673-9.
19. Coltel, N., et al., *Cerebral malaria -- a neurovascular pathology with many riddles still to be solved*. Curr Neurovasc Res, 2004. 1(2): p. 91-110.
20. Grau, G.E., et al., *Tumor-necrosis factor and other cytokines in cerebral malaria: experimental and clinical data*. Immunol Rev, 1989. 112: p. 49-70.
21. Grau, G.E., et al., *Involvement of tumour necrosis factor and other cytokines in immune-mediated vascular pathology*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1989. 88(1-2): p. 34-9.
22. Kwiatkowski, D., et al., *TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. Lancet, 1990. 336(8725): p. 1201-4.
23. Grau, G.E., et al., *Late administration of monoclonal antibody to leukocyte function-antigen 1 abrogates incipient murine cerebral malaria*. Eur J Immunol, 1991. 21(9): p. 2265-7.
24. Malvry D, D.F., Thiebaut R, Le Bras M., *Plasmodies-Malaria. Formes cliniques, diagnostic*. Encycl Méd Chir, Maladies Infectieuses, 2000. 8-507-A-20: p. 16 p.
25. Doolan, D.L., C. Dobano, and J.K. Baird, *Acquired immunity to malaria*. Clin Microbiol Rev, 2009. 22(1): p. 13-36, Table of Contents.
26. Scholzen, A. and R.W. Sauerwein, *How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in Plasmodium infection*. Trends Parasitol, 2013. 29(5): p. 252-62.
27. Liehl, P. and M.M. Mota, *Innate recognition of malarial parasites by mammalian hosts*. Int J Parasitol, 2012. 42(6): p. 557-66.
28. Amino, R., et al., *Quantitative imaging of Plasmodium transmission from mosquito to mammal*. Nat Med, 2006. 12(2): p. 220-4.

29. Chakravarty, S., et al., *CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes*. Nat Med, 2007. 13(9): p. 1035-41.
30. Gueirard, P., et al., *Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(43): p. 18640-5.
31. Orago, A.S. and C.A. Facer, *Cytotoxicity of human natural killer (NK) cell subsets for Plasmodium falciparum erythrocytic schizonts: stimulation by cytokines and inhibition by neomycin*. Clin Exp Immunol, 1991. 86(1): p. 22-9.
32. Mavoungou, E., A.J. Luty, and P.G. Kremsner, *Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells in vitro*. Eur Cytokine Netw, 2003. 14(3): p. 134-42.
33. Roland, J., et al., *NK cell responses to Plasmodium infection and control of intrahepatic parasite development*. J Immunol, 2006. 177(2): p. 1229-39.
34. Cohen, S., G.I. Mc, and S. Carrington, *Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria*. Nature, 1961. 192: p. 733-7.
35. Bouharoun-Tayoun, H. and P. Druilhe, *Plasmodium falciparum malaria: evidence for an isotype imbalance which may be responsible for delayed acquisition of protective immunity*. Infect Immun, 1992. 60(4): p. 1473-81.
36. Sarthou, J.L., et al., *Prognostic value of anti-Plasmodium falciparum-specific immunoglobulin G3, cytokines, and their soluble receptors in West African patients with severe malaria*. Infect Immun, 1997. 65(8): p. 3271-6.
37. Wahlin, B., et al., *Human antibodies to a Mr 155,000 Plasmodium falciparum antigen efficiently inhibit merozoite invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. 81(24): p. 7912-6.
38. Udeinya, I.J., et al., *Falciparum malaria-infected erythrocytes specifically bind to cultured human endothelial cells*. Science, 1981. 213(4507): p. 555-7.
39. Treutiger, C.J., et al., *Rosette formation in Plasmodium falciparum isolates and anti-rosette activity of sera from Gambians with cerebral or uncomplicated malaria*. Am J Trop Med Hyg, 1992. 46(5): p. 503-10.
40. Stanisic, D.I., et al., *Immunoglobulin G subclass-specific responses against Plasmodium falciparum merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness*. Infect Immun, 2009. 77(3): p. 1165-74.
41. Roussilhon, C., et al., *Long-term clinical protection from falciparum malaria is strongly associated with IgG3 antibodies to merozoite surface protein 3*. PLoS Med, 2007. 4(11): p. e320.
42. Malkin, E.M., et al., *Phase 1 clinical trial of apical membrane antigen 1: an asexual blood-stage vaccine for Plasmodium falciparum malaria*. Infect Immun, 2005. 73(6): p. 3677-85.
43. Podack, E.R. and A. Kupfer, *T-cell effector functions: mechanisms for delivery of cytotoxicity and help*. Annu Rev Cell Biol, 1991. 7: p. 479-504.
44. Seder, R.A. and R. Ahmed, *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation*. Nat Immunol, 2003. 4(9): p. 835-42.
45. Suss, G., et al., *Roles of CD4- and CD8-bearing T lymphocytes in the immune response to the erythrocytic stages of Plasmodium chabaudi*. Infect Immun, 1988. 56(12): p. 3081-8.
46. Nardin, E.H. and R.S. Nussenzweig, *T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages*. Annu Rev Immunol, 1993. 11: p. 687-727.
47. Hill, A.V., et al., *Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria*. Nature, 1991. 352(6336): p. 595-600.
48. Aidoo, M. and V. Udhayakumar, *Field studies of cytotoxic T lymphocytes in malaria infections: implications for malaria vaccine development*. Parasitol Today, 2000. 16(2): p. 50-6.
49. Sancho, D., M. Gomez, and F. Sanchez-Madrid, *CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation*. Trends Immunol, 2005. 26(3): p. 136-40.

50. McHeyzer-Williams, M. and M.C. Nussenzweig, *Introduction to the section on lymphocyte activation and effector function*. *Curr Opin Immunol*, 2009. 21(3): p. 241-3.
51. Reddy, M., et al., *Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function*. *J Immunol Methods*, 2004. 293(1-2): p. 127-42.
52. Ferenczi, K., et al., *CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: blood and skin comparisons by flow cytometry*. *J Autoimmun*, 2000. 14(1): p. 63-78.
53. Worku, S., et al., *Lymphocyte activation and subset redistribution in the peripheral blood in acute malaria illness: distinct gammadelta+ T cell patterns in Plasmodium falciparum and P. vivax infections*. *Clin Exp Immunol*, 1997. 108(1): p. 34-41.
54. Santis, A.G., et al., *Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway*. *Eur J Immunol*, 1992. 22(5): p. 1253-9.
55. D'Ambrosio, D., et al., *Transcriptional regulation of interleukin-2 gene expression by CD69-generated signals*. *Eur J Immunol*, 1993. 23(11): p. 2993-7.
56. Theze, J., P.M. Alzari, and J. Bertoglio, *Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions*. *Immunol Today*, 1996. 17(10): p. 481-6.
57. Maecker, H.T., J.P. McCoy, and R. Nussenblatt, *Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project*. *Nat Rev Immunol*, 2012. 12(3): p. 191-200.
58. Saissy, J.M., B. Rouvin, and P. Koulmann, *[Severe malaria in intensive care units in 2003]*. *Med Trop (Mars)*, 2003. 63(3): p. 258-66.
59. Akogbeto, M., J.P. Chippaux, and M. Coluzzi, *[Coastal urban malaria in Cotonou (Republic of Benin). Entomological study]*. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 1992. 40(4): p. 233-9.
60. Gonzalez-Amaro, R., et al., *Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?* *Trends Mol Med*, 2013. 19(10): p. 625-32.
61. Gay, F., et al., *Cerebral malaria: what is known and what is on research*. *Rev Neurol (Paris)*, 2012. 168(3): p. 239-56.
62. Modiano, D., et al., *Leucocytosis in severe malaria*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001. 95(2): p. 175-6.
63. Torre, D., et al., *Role of Th1 and Th2 cytokines in immune response to uncomplicated Plasmodium falciparum malaria*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002. 9(2): p. 348-51.
64. Banic, D.M., et al., *Human leukocyte antigen class II control of the immune response to p126-derived amino terminal peptide from Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*, 2002. 66(5): p. 509-15.
65. Lauzurica, P., et al., *Phenotypic and functional characteristics of hematopoietic cell lineages in CD69-deficient mice*. *Blood*, 2000. 95(7): p. 2312-20.
66. Johnson, A.H., et al., *Human leukocyte antigen class II alleles influence levels of antibodies to the Plasmodium falciparum asexual-stage apical membrane antigen 1 but not to merozoite surface antigen 2 and merozoite surface protein 1*. *Infect Immun*, 2004. 72(5): p. 2762-71.

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: EVALUATION 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