



HAL
open science

Analyse des facteurs d'hôte et facteurs parasitaires dans le paludisme grave d'importation

Nicolas Argy

► **To cite this version:**

Nicolas Argy. Analyse des facteurs d'hôte et facteurs parasitaires dans le paludisme grave d'importation. Parasitologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015US-PCB093 . tel-01535631

HAL Id: tel-01535631

<https://theses.hal.science/tel-01535631v1>

Submitted on 9 Jun 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Ecole doctorale Médicaments, Toxicologie, Chimie et Imageries

Année : 2015

N° :

THESE

Spécialité : parasitologie

Présenté par

Nicolas Argy

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

Analyse des facteurs d'hôte et facteurs parasitaires dans le paludisme
grave d'importation

Soutenue le :

6 Juillet 2015

Devant le jury composé de :

Mme le Docteur Sylviane Pied	Rapporteur
M. le Professeur Antoine Berry	Rapporteur
M. le Professeur Olivier Bouchaud	Président du jury
M. le Professeur Michel Wolff	Examineur
M. Le Docteur Nicaise Tuikue Ndam	Examineur
M. Le Docteur Antoine Claessens	Examineur
Mme le Professeur Sandrine Houzé	Directeur de thèse

Résumé

L'infection palustre par *Plasmodium falciparum* est une infection parasitaire des zones intertropicales, responsable de centaines de milliers de morts par an principalement chez les enfants de moins de cinq ans. Le paludisme constitue également un problème en France par l'importation de cas chez le voyageur de retour de zone d'endémie. L'infection à *Plasmodium falciparum* dans cette population, considérée comme à risque de développer les formes graves de la maladie, peut se présenter sous différentes formes cliniques plus ou moins associées au risque de mortalité. Même si certains facteurs de risque de gravité tels que l'âge et l'immunité ont été identifiés, peu de données existent sur cette interaction complexe hôte-parasite dans le paludisme d'importation. L'objectif de ces travaux de thèse repose sur l'analyse des facteurs d'hôte et des facteurs parasitaires intervenant dans le paludisme d'importation.

A travers le réseau de surveillance du centre national de référence du paludisme en France métropolitaine, l'ensemble des données démographiques, épidémiologiques, cliniques et biologiques des cas de paludisme d'importation, notifiés entre 2011 et 2015, ont été collectées ainsi que les échantillons ayant servis au diagnostic. Après expertise diagnostique, le dosage des antipaludéens, la quantification d'HRP2 ainsi que pour la sérologie anti-palustre ont été réalisés à partir du plasma. L'ARN extrait par le TRIZOL® à partir du culot globulaire a été utilisé pour l'étude de l'expression des gènes *var* et des domaines cassettes (DC) par qRT-PCR. Le culot de globules rouges parasités a été mis en culture pour la maturation des formes parasitaires en vue de l'étude du phénotype de cytoadhérence sur les récepteurs solubles CD36, ICAM-1, EPCR et du phénomène de *rosetting*. L'ensemble de ces études a été réalisé sur une population de patients groupée en migrants de première génération, migrants de deuxième génération et voyageurs/expatriés et dont la présentation clinique du paludisme d'importation a été classée en paludisme « très grave », paludisme « grave » et paludisme « simple ».

L'âge élevé, l'origine ethnique, la profondeur de la thrombopénie et l'absence d'antécédents de paludisme ont été identifiés comme des facteurs de risque associés à la survenue d'un accès palustre « très grave », caractérisé pour une biomasse parasitaire séquestrée élevée. L'effet de la pré-exposition au parasite, reflété par le statut sérologique des patients, semble être à l'origine de la présentation clinique de la maladie en limitant notamment la biomasse parasitaire séquestrée. L'étude de l'expression des gènes *var* et des DC réalisée en fonction de la présentation clinique, de l'origine ethnique et du statut sérologique des patients, a révélé une surexpression du groupe de gènes *var* A et B ainsi que de DC4, DC8 et DC13 dans le paludisme « grave » et « très grave » d'importation. L'étude du phénotype de cytoadhérence et du *rosetting* a identifié le *rosetting* comme le phénotype d'adhérence à l'origine de l'accès palustre « très grave ». Le profil d'expression des gènes *var* et DC a confirmé les observations antérieures et corréle le phénotype de *rosetting* à l'expression de DC4 et DC8.

Ces résultats, obtenus dans le cadre du paludisme d'importation, sont en accord avec les données issues des études menées chez les enfants en zone d'endémie et apportent des précisions sur les interactions hôte-parasite lors du paludisme grave, en émettant notamment l'hypothèse d'une protection à long terme chez les voyageurs déjà exposés au paludisme, qui limiterait la séquestration parasitaire. L'expression des gènes des groupes A, B, DC4, DC8 et DC13 au sein de cette population hétérogène de patients dans le paludisme « très grave » d'importation confirme l'expression de ces gènes dans cette population à risque ce qui laisse suggérer une expression non aléatoire des gènes *var* et DC. Enfin, le *rosetting* est également retrouvé comme un facteur de risque de paludisme « très grave » d'importation, ce qui témoigne d'une similitude des mécanismes physiopathologiques de l'accès grave, quelque soit la population infectée. Le paludisme d'importation présente de nombreuses similitudes avec le paludisme grave en zone d'endémie, ce qui peut constituer une population d'étude intéressante en complément des populations en zone d'endémie.

REMERCIEMENTS

Je tenais à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, le Professeur Sandrine Houzé, pour m'avoir proposé ce travail de thèse et m'avoir épaulé durant toutes ces années. Merci infiniment Sandrine de m'avoir ouvert les portes du laboratoire de parasitologie de l'hôpital Bichat-Claude Bernard et celles du laboratoire du centre national de référence du paludisme afin que je puisse y effectuer mes travaux et y exercer ma passion pour la parasitologie. Merci infiniment pour votre disponibilité, pour votre confiance au quotidien, pour votre soutien moral, intellectuel et logistique et pour la liberté qui m'a été offerte durant mes travaux malgré votre omniprésence à mes côtés.

Je tenais également à exprimer ma reconnaissance envers le Dr Philippe Deloron pour m'avoir accueilli au sein de son unité. Merci infiniment Monsieur Deloron, c'est un immense honneur pour moi de pouvoir travailler dans cette équipe.

Je remercie le Docteur Sylviane Pied et le Professeur Antoine Berry pour avoir accepté de juger mon travail en plus de leurs activités respectives.

Je remercie les Professeurs Michel Wolff et Olivier Bouchaud ainsi que les Docteurs Nicaise Tuikue Ndam et Antoine Claessens pour leur présence dans mon jury de thèse et pour avoir examiné mon travail.

Je remercie très chaleureusement les « filles du CNR », Véronique Hubert-Sarrasin, Céline Maréchal, Dr Sandrine Cojean, Claire Augé-Courtois et Camille Moisant pour leur participation active à ce travail, pour leur vigilance au quotidien concernant l'inclusion des échantillons de patients, pour leur support technique et pour leur bonheur humeur quotidienne.

Je remercie mon collègue du CNR paludisme, Eric Kendjo, pour m'avoir aidé dans l'exploitation statistique de mes résultats. Je repense aux longues heures passées ensemble où tu essayais de m'expliquer les statistiques, je ne sais pas si je suis meilleur maintenant mais je te remercie pour ton aide précieuse.

Je remercie mes collègues du laboratoire de parasitologie de l'hôpital Bichat, Dr Christian Chochillon, Dr Djamel Haouchine, Dr Elisabeth Forget, Dr René Nabias ainsi que Florianne Ferreira, Vincent Samson, Maribel Rodriguez et Aurelia Chamming's pour m'avoir laissé une certaine liberté pour effectuer mes travaux de thèse.

Je remercie tous les Docteurs de l'unité MERIT UMR216, Michel Cot, Jerome Clain, Gwladys Bertin, Nicaise Tuikue Ndam, Jacqueline Milet, Romain Duval, Rachida Tahar, Sayeh Guemouri, Audrey Sabbagh, Anais Mercks, André Garcia, Valérie Briand, Gilles Cottrell, Florence Migot-Nabias, David Courtin, Adrian Luty, Jean-Yves LeHesran, Carines Baxerres, et Jean-Gérard Gobert ainsi que Magalie Dambrun, Murielle Lohezic, Pascal Jeanjean, Brigitte Amata et Carmen Mora pour leur accueil dans l'unité et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir ensemble et qui m'ont fait progresser dans mon travail.

Je remercie tous les correspondants du CNR Paludisme et particulièrement ceux qui ont participé activement à ce travail et à la collecte des données des patients.

Je remercie Laure, Guillaume, Komi, Rafiou, Talleh, Justin et Azizath pour leur aide et soutien.

Je remercie ma femme, Nathalie, pour son courage et son soutien sans failles durant toutes ces années.

Je remercie mes parents pour leurs efforts consentis depuis toutes années.

A ma famille, ma belle famille et à mes amis Olivier, Aymeric, Jérôme, Thomas, Stéphane, Arnaud, Camille, Benjamin et tous les autres qui m'ont encouragé.

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	9
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	14
INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE 1 : REVUES BIBLIOGRAPHIQUES.....	19
I. Le paludisme : généralités	19
1. L'agent pathogène : <i>Plasmodium spp.</i>	19
a. Historique.....	19
b. Phylogénie et principales espèces retrouvées chez l'homme	21
c. Cycle parasitaire de <i>Plasmodium falciparum</i>	21
2. Epidémiologie du paludisme	23
a. Epidémiologie mondiale.....	23
b. Epidémiologie du paludisme d'importation en France métropolitaine	25
3. Les différentes formes cliniques de l'accès palustre.....	26
a. Accès palustre grave	26
i. Définition de l'accès palustre grave selon l'OMS (score OMS)	26
ii. Facteurs de gravité dans le contexte de paludisme d'importation.....	29
iii. Atteinte neurologique ou neuropaludisme (accès pernicieux).....	30
iv. Autres formes graves non neurologiques	31
b. Accès palustre simple.....	32
c. Forme clinique atypique : accès palustre chez la femme enceinte	33
4. Le diagnostic biologique du paludisme	33
a. Eléments d'orientation et principe de réalisation du diagnostic biologique.....	33
b. Le frottis sanguin	34
c. La goutte épaisse	36
d. Les tests de diagnostics rapides (TDR)	36
e. La détection à l'acridine orange.....	38
f. Diagnostic biologique par amplification génique (PCR).....	40
g. Les autres marqueurs biologiques d'orientation associés à l'accès palustre	41
h. Diagnostic biologique indirect : la sérologie anti-palustre.....	43
II. Physiopathologie de l'accès palustre grave	45
1. La séquestration parasitaire.....	45
a. Formation des knobs.....	46
b. PfEMP1.....	48
c. Les récepteurs de l'hôte impliqués	52
d. Les gènes <i>var</i>	58
2. Les mécanismes immunopathologiques	63
3. Conséquences de l'infection par <i>Plasmodium falciparum</i>	66
a. Au niveau cellulaire.....	66
b. Au niveau clinico-biologique.....	69
III. L'immunité anti-palustre	70
1. Dogme de l'acquisition de l'immunité naturelle.....	70
a. Historique.....	70
b. Influence de l'âge et du temps d'exposition au parasite	70
c. Influence des infections à répétition.....	72
d. Influence de l'endémicité.....	73
e. Cas particulier du paludisme d'importation	74
2. La réponse immunitaire dirigée contre PfEMP1.....	74

a. Le rôle des anticorps	74
b. Les effets de la réponse immunitaire humorale lors de l'infection palustre	76
3. Les effets immunomodulateurs de <i>Plasmodium falciparum</i>	77
CHAPITRE 2 : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE THESE	79
I. Objectifs de la thèse	82
II. Cadre de l'étude	82
1. Réseau du centre national de référence du paludisme	82
2. Diagnostic parasitologique au laboratoire du CNR	83
3. Critères d'inclusion des échantillons/patients	83
RESULTATS	85
CHAPITRE 1: LIMITATION DE LA SEQUESTRATION DE <i>P. FALCIPARUM</i> APRES PRE EXPOSITION AU PARASITE DANS LE PALUDISME D'IMPORTATION EN FRANCE	86
CHAPITRE 2 : ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES VAR ET DE DOMAINES CASSETTES DANS LE CONTEXTE DU PALUDISME D'IMPORTATION	120
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DU PHENOTYPE DE CYTOADHERENCE DES ISOLATS DE <i>P. FALCIPARUM</i> DANS LE CADRE DU PALUDISME D'IMPORTATION	159
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	202
REFERENCES	214

LISTE DES ABREVIATIONS

ACD : Acide citrique-Dextrose

ADN : Acide désoxyribonucléique

APG : Accès Palustre Grave

APS : Accès Palustre Simple

ARN : Acide ribonucléique

BSA : *Bovin Serum Albumin*

CIDR : Cystein Rich Interdomain Region

CNR : Centre National de Référence

CRP : C Reactive Protein

DBL : Duffy Binding Like

DC : Domain Cassette

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

GR: globule rouge

HB : Homology Block

HRP2 : Histidine Rich Protein 2

Hz : Hémotoïne

IC : Intervalle de confiance

IFI : Immunofluorescence indirecte

IFN- γ : Interféron gamma

IL : Interleukine

J0 : Prélèvement sanguin utilisé pour le diagnostic parasitologique initial

KAHRP : Knob-Associated Histidine Rich Protein

MESA : Mature Erythrocyte Surface Antigen

MGG : May-Grünwald-Giemsa

MP: Microparticules

NK : Natural Killer

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : Odds Ratio

PBS : *Phosphate Buffered Salt*

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCT : Procalcitonine

pLDH : Plasmodium Lactate Deshydrogénase

PfEMP1 : *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1

PG : Paludisme grave

PSPB : Position Specific Polymorphic Block

PTG : Paludisme très grave

QBC : Quantitative Buffy Coat

RESA : Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen

RPMI : Roswell Park Memorial Institut

RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

TDR : Test de Diagnostic Rapide

TGF : *Tumor Growth factor*

TLR: *Toll-Like Recepteur*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

Tu : *Transcrits units*

UPS : *Upstream region* (région promotrice)

UTR : *Untranslated region* (région non codante)

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VSA : *Variant Surface Antigen*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Planche illustrée de l'hématozoaire responsable du paludisme réalisée par Alphonse Laveran.	20
Figure 2 : Cycle parasitaire de <i>Plasmodium falciparum</i>	23
Figure 3 : Répartition mondiale de l'infection à <i>Plasmodium spp</i>	24
Figure 4 : Frottis sanguin : trophozoïtes de <i>Plasmodium falciparum</i> (May-Grünwald-Giemsa).	35
Figure 5 : Goutte épaisse avec gamétocytes et trophozoïtes de <i>Plasmodium falciparum</i> (Giemsa)	37
Figure 6 : Trophozoïtes fluorescents avec la technique du QBC.....	39
Figure 7 : Phénotypes d'adhérence impliqués dans le phénomène de séquestration parasitaire.	46
Figure 8 : Knobs à la surface du globule rouge parasité par microscopie électronique	47
Figure 9 : Principales familles de protéines composant le groupe des VSA à la surface des globules rouges parasités.	48
Figure 10 : Représentation schématique de différents domaines d'une protéine PfEMP1.....	49
Figure 11 : Représentation schématique des domaines protéiques composant les domaines cassettes (A) DC8 et DC13 [82], (B) DC4 [78] et (C) DC5.....	51
Figure 12 : Représentation schématique de l'interaction entre la protéine parasitaire transmembranaire PfEMP1 et les récepteurs cellulaires de l'hôte.	52
Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation d'un gène <i>var</i> codant pour une protéine PfEMP1.	59
Figure 14 : Principaux mécanismes physiopathologiques au niveau des cellules endothéliales à l'origine de la rupture de la barrière endothéliale	66
Figure 15 : Niveau d'expression des groupes de gènes <i>var</i> BC1 (A) et Var1 (B) en fonction de la catégorie clinique des patients.....	141
Figure 16 : Niveau d'expression des groupes de gènes <i>var</i> C1 (A), Var2 (B) et CIDR α 1.6 (C) en fonction du groupe d'exposition des patients.	142
Figure 17 : Scatterplot des clusters de patients suivant les axes factoriels explicatifs obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, statut sérologique et des niveaux d'expression des groupes de gènes <i>var</i>	143
Figure 18 : Scatterplot des clusters de patients suivant les axes factoriels explicatifs obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, statut sérologique et des niveaux d'expression des DC.....	147
Figure 19 : Profil des niveaux d'expression des groupes de gènes <i>var</i> (A) et des DC (B) selon le groupe de cluster définis.	151
Figure 20 : Niveau de cytoadhérence aux récepteurs CD36, ICAM-1 et EPCR (A) et fréquence de <i>rosetting</i> (B) en fonction du groupe de patients exposés.	174

Figure 21 : Niveau d'expression des gènes <i>var</i> et DC avant et après maturation en culture pour chaque isolat testé.....	177
Figure 22 : Expression des gènes A1 (A), B1 (B), B2 (C), DBL γ 4/6 (D), CIDR α 1.1 (E) et DBL β 3 (F) en fonction de la catégorie clinique des patients.	179
Figure 23 : Niveau d'expression des gènes du groupe A1 (A) et A3 (B) en fonction du groupe d'exposition des patients.....	180
Figure 24 : Scatterplot des clusters de patients suivant les axes factoriels explicatifs obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, et des niveaux d'expression des groupes de gènes <i>var</i>	181
Figure 25 : Scatterplot des clusters de patients suivant les axes factoriels explicatifs obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, et des niveaux d'expression des DC.	185
Figure 26 : Profil des niveaux d'expression des groupes de gènes <i>var</i> et des DC selon le groupe de cluster défini.....	189
Figure 27 : Relation entre le niveau d'expression d'A3, DBL α 2/ α 10.1/2/4/7, DBL β 3, DBL β 12-DBL β 3/5 et DBL α 1.4 avec le rosetting (A, B, C), ICAM-1 (D), CD36 (E) et EPCR (F).....	191

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères de gravité cliniques et biologiques dans l'accès palustre grave chez l'adulte selon la définition de l'OMS révisée en 2000	27
Tableau 2 : Critères de gravité cliniques et biologiques de l'accès palustre grave chez l'enfant selon la définition de l'OMS de 2000.....	28
Tableau 3 : Couples de primers utilisés pour l'étude de l'expression des gènes <i>var</i> et leurs régions cibles correspondantes.	132
Tableau 4 : Couples de primers utilisés pour amplifier les régions codantes les domaines protéiques correspondants aux domaines cassettes DC4, DC5, DC8 et DC13.....	133
Tableau 5 : Données épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients inclus dans l'étude du profil d'expression des gènes <i>var</i> et des domaines cassettes dans le cadre du paludisme d'importation.....	139
Tableau 6 : Données épidémiologiques et biologiques des patients exposés inclus dans l'étude du profil d'expression des gènes <i>var</i> et des domaines cassettes dans le cadre du paludisme d'importation.....	140
Tableau 7 : Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, statut sérologique et des niveaux d'expression des groupes de gènes <i>var</i>	146
Tableau 8 : Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, statut sérologique et des niveaux d'expression des DC.....	149
Tableau 9 : Caractéristiques épidémiologiques et biologiques des patients inclus entre 2013 et 2015 pour l'étude de phénotypage de la cytoadhérence dans le cadre du paludisme d'importation.	173
Tableau 10 : Relation entre le phénotype d'adhérence des isolats cliniques de <i>Plasmodium falciparum</i> et la présentation clinique de l'infection palustre.....	176
Tableau 11 : Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition et des niveaux d'expression des gènes <i>var</i>	183
Tableau 12 : Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition et des niveaux d'expression des DC.	187

INTRODUCTION

Le paludisme, troisième fléau infectieux, est une infection parasitaire à transmission vectorielle de répartition mondiale qui sévit principalement en zone intertropicale. Cinq espèces de plasmodium sont impliquées en pathologie humaine : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi* mais c'est essentiellement l'infection par *Plasmodium falciparum* qui est potentiellement mortelle pour l'homme. En 2013, 198 millions de cas de paludisme ont été estimés dans le monde (80% en Afrique subsaharienne) associés à environ 584.000 décès dont 90% observés en Afrique subsaharienne [1]. En zone d'endémie, contrairement aux adultes, ce sont principalement les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes et les personnes âgées, non immunisés contre les formes graves de l'infection à *Plasmodium falciparum*, qui sont les plus durement touchés avec un taux de mortalité élevé pouvant aller jusqu'à 20% dans certaines régions [1].

Le processus physiopathologique, à l'origine d'un accès palustre grave à *Plasmodium falciparum*, repose sur la séquestration des globules rouges parasités dans la microcirculation des veinules post-capillaires. Cette séquestration, indispensable au parasite pour échapper à la clairance splénique, résulte de l'interaction entre une protéine parasitaire exportée à la surface des globules rouges parasités, appelée *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1), de composition variable, et divers récepteurs situés à la surface des cellules endothéliales, des globules rouges et des plaquettes de l'hôte. Cette interaction a pour conséquence la fixation des globules rouges parasités aux cellules de l'hôte provoquant une obstruction progressive des capillaires associée à une réduction du flux sanguin dans différents organes dont le système nerveux central, à l'origine du tableau de neuropaludisme, forme clinique majeure de l'accès palustre grave chez les populations de patients à risque.

La synthèse de cette protéine parasitaire PfEMP1, considérée comme un facteur de virulence de *Plasmodium falciparum*, est liée à l'expression d'une famille de gènes, appelés les gènes

var. Cette famille d'environ 60 gènes, de séquences hypervariables et répartie sur l'ensemble du génome de *Plasmodium falciparum*, code pour ces protéines transmembranaires selon un principe d'exclusion allélique mutuelle qui permet au parasite de n'exposer qu'un seul type de PfEMP1 aux stades matures. La très forte variabilité de cette famille de gènes, issue de fréquentes recombinaisons notamment au niveau des régions subtélomériques chromosomiques, est responsable de modifications de la séquence protéique de PfEMP1 permettant au parasite d'échapper au système immunitaire de l'hôte mais aussi de faire varier son phénotype d'adhérence vis-à-vis des récepteurs cellulaires de l'hôte. Malgré une mosaïque de séquences génomiques et protéiques dans une population de parasites donnée, les gènes *var* et PfEMP1 ont pu être classés respectivement en différents groupes A, B, C, Var1, Var2, Var3 et en domaines cassettes (DC), en fonction de leur similitude de séquences et de leur organisation. L'expression de ces différents groupes de gènes *var* ou séquences protéiques spécifiques serait corrélée à un contexte clinique donné mais les divers résultats générés peuvent être contradictoires selon les études menées.

Avec l'augmentation des échanges internationaux et du tourisme entre pays développés et en voie de développement [2], le nombre d'accès palustre à *Plasmodium falciparum* devant être pris en charge dans ces pays non endémiques augmente et est à l'origine de problèmes diagnostiques et thérapeutiques [3]. Avec plus de 4100 cas de paludisme estimés en 2013 [4], la France demeure le pays européen non endémique le plus touché par le paludisme d'importation. La population de patients rencontrée dans ce contexte de paludisme d'importation est extrêmement hétérogène, composée d'adultes et d'enfants, de voyageurs originaires de France ou de zones d'endémie, d'africains et de caucasiens essentiellement. Des facteurs de risque de paludisme grave ont été identifiés dans ce contexte d'importation chez ces groupes de patients mais les résultats restent variables selon les études du fait de la population choisie [5]–[7]. Ainsi, cette population de patients présentant des caractéristiques

épidémiologiques, démographiques, cliniques et biologiques très différentes rend son étude très complexe et difficilement comparable aux données obtenues en zone d'endémie dans des populations différentes.

Les travaux réalisés et présentés s'inscrivent dans ce contexte de paludisme d'importation et ont pour objectifs d'identifier les facteurs de risque de développer un accès palustre grave par l'étude des données épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients ayant présenté un accès grave comparativement aux patients avec un accès palustre simple à *Plasmodium falciparum*. L'étude de l'expression des gènes *var* et l'exploration du phénotype de cytoadhérence des isolats ont été réalisées pour approcher les mécanismes physiopathologiques mis en jeu lors de l'interaction hôte-parasite dans un contexte de paludisme d'importation.

Chapitre 1 : Revues bibliographiques

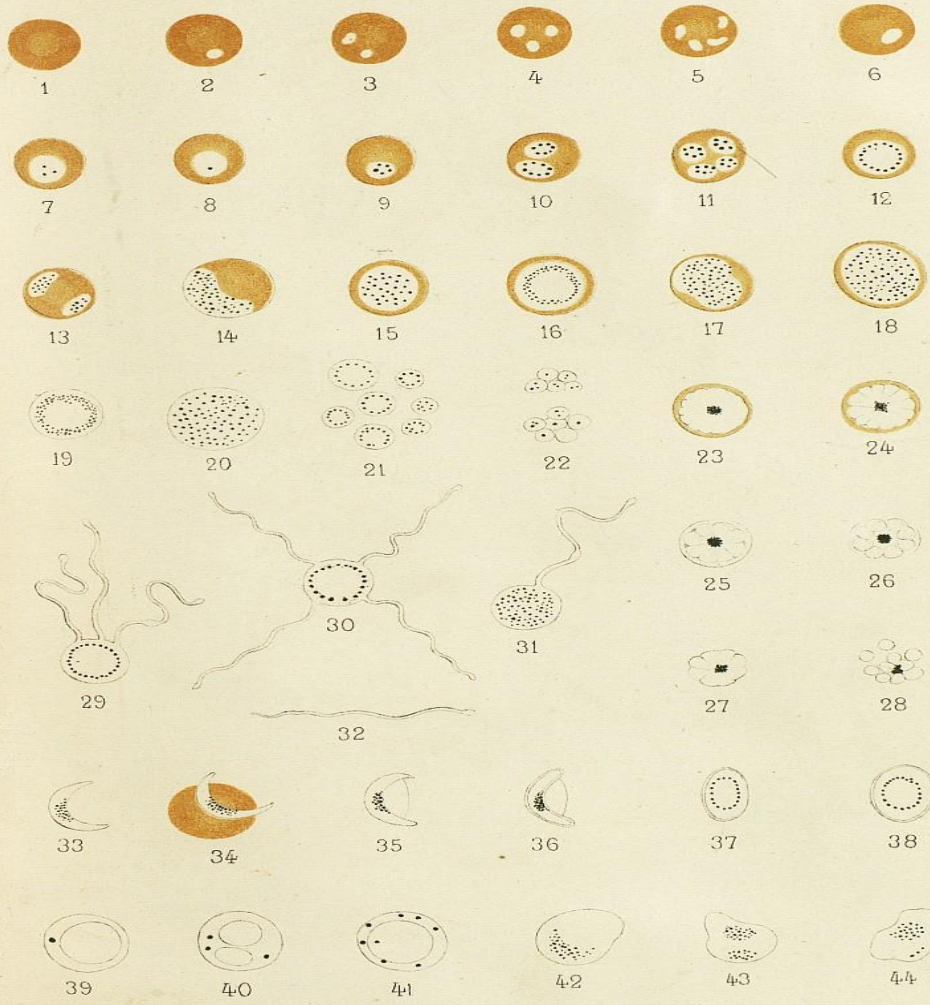
I. Le paludisme : généralités

1. L'agent pathogène : *Plasmodium spp.*

a. Historique

Le paludisme ou malaria en anglais, tire son nom du latin *palus* qui signifie « marais » et du mot d'origine italienne *mal'aria* évoquant « le mauvais air », cause présumée à l'époque de l'apparition de la maladie. Cette pathologie infectieuse, responsable de « la fièvre intermittente », sévissait déjà à l'époque de la Rome antique et n'avait pas d'agent étiologique connu. Néanmoins, la malaria était déjà fortement associée à des facteurs environnementaux comme la présence de marais et d'eau stagnante [8]. Ce ne fut qu'en 1878 à Bône en Algérie, que le médecin militaire Alphonse Laveran mis en évidence dans le sang d'un malade impaludé la présence de corps en croissant pigmenté qu'il qualifia comme agent parasite responsable du paludisme. Deux ans plus tard à Constantine, le 6 novembre 1880, Alphonse Laveran confirma sa précédente découverte en visualisant une exflagellation de gamétocytes de *Plasmodium falciparum* [8], [9]. En 1884, Alphonse Laveran émit également l'hypothèse de la présence du parasite chez les moustiques, agents vecteurs de la maladie, mais celle-ci ne fut confirmée qu'en 1894 par Ronald Ross et Patrick Manson. La même année, suite aux travaux initiés par Laveran et grâce aux progrès techniques, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae* étaient déjà décrits. Pour la rédaction du traité sur le paludisme et pour l'ensemble de ses travaux, Laveran reçoit le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1907 (figure 1).

Planche I.



Laveran del.

Nicolet lith.

Imp Lemerrier & C^{ie} Paris

Source gallica.bnf.fr / Bibliothèque nationale de France

Figure 1 : Planche illustrée de l'hématozoaire responsable du paludisme réalisée par Alphonse Laveran [10].

b. Phylogénie et principales espèces retrouvées chez l'homme

Plasmodium spp. est un genre appartenant à l'embranchement des Apicomplexa composé d'organismes unicellulaires eucaryotes, parasites intracellulaires obligatoires. Ces parasites, dépourvus de flagelles, sauf à un certain stade de la reproduction sexuée, sont à locomotion réduite. Lors de son développement, le génome de *Plasmodium* alterne entre un état haploïde et un état diploïde.

Il existe de nombreuses espèces de *Plasmodium spp.* qui sont parasites de mammifères mais seules 5 espèces sont incriminées en pathologie humaine : *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* et *Plasmodium knowlesi*. Ces espèces diffèrent principalement par la répartition géographique de leurs zones d'endémie, leurs caractéristiques morphologiques et la durée de leur phase de schizogonie exo-érythrocytaire et intra-érythrocytaire (48 heures pour *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium ovale*, 72 heures pour *Plasmodium malariae* et 24 heures pour *Plasmodium knowlesi*). Dans la suite de ce travail, nous ne nous intéresserons qu'à l'espèce *Plasmodium falciparum*.

c. Cycle parasitaire de *Plasmodium falciparum*

Plasmodium falciparum possède un cycle hétéroxène faisant intervenir 2 hôtes (figure 2) : (1) l'hôte définitif, où s'effectue la reproduction sexuée, est un moustique femelle hématophage du genre *Anopheles* dont 25 espèces parmi plus de 400 sont connues pour être de bons vecteurs du paludisme et (2) l'hôte intermédiaire, où s'effectue la reproduction asexuée, est représenté par l'homme. L'homme est contaminé en zone d'endémie lors du repas sanguin d'un anophèle femelle inoculant à partir de ses glandes salivaires des millions de sporozoïtes mobiles et infectants. Les sporozoïtes sont déversés au site de la pique et restent quelques minutes dans la peau avant de passer dans la circulation lymphatico-sanguine pour rejoindre les hépatocytes de l'hôte et les envahir pour s'y multiplier [11]. Un sporozoïte peut donner,

après une multiplication intense, de 10.000 à 30.000 mérozoïtes en quelques jours (6 à 8 jours) [11]. Après maturation et formation de schizontes intra-hépatiques, l'hépatocyte se rompt et libère ces nouvelles formes mérozoïtes qui gagnent la circulation sanguine. Cette phase de migration des sporozoïtes du site d'inoculation à l'hépatocyte et le développement hépatique dite « phase hépatique pré-patente ou exo-érythrocytaire » sont cliniquement silencieux et durent environ 7 à 12 jours pour *Plasmodium falciparum*.

La phase sanguine dite « phase intra-érythrocytaire » correspond à la phase clinique de l'infection. Cette phase suit la phase hépatique parasitaire et débute lors de la libération des mérozoïtes intra-hépatiques dans la circulation sanguine. Ces formes parasitaires, après avoir pénétrées dans le globule rouge, se différencient en trophozoïtes et se multiplient par reproduction asexuée (schizogonie) pour se transformer en schizonte. A maturité, la membrane du globule rouge parasité par un schizonte mûr se rompt et 16 à 24 mérozoïtes filles sont libérés perpétuant ainsi le cycle intra-érythrocytaire. Lors de ce développement intra-érythrocytaire par mitoses successives, le parasite se nourrit du contenu du globule rouge, modifie la paroi de celui-ci en y insérant des protéines parasitaires et détoxifie les produits de dégradation de l'hémoglobine telle que l'hème sous forme de cristaux inertes appelés hémozoïne [11]. Ce cycle asexué est de 48 heures pour *Plasmodium falciparum* et les différentes formes parasitaires constituant ce cycle peuvent être détectées par microscopie lors du diagnostic parasitologique. Sous l'effet d'un stress ou d'autres stimuli, une partie des formes trophozoïtes asexuées peut se différencier en gamétocytes mâle et femelle qui sont les formes sexuées non répliquatives du parasite, éliminées passivement au cours de l'infection au niveau du filtre de la rate si elles ne sont pas prélevées par le vecteur. Cette gamétocytogénèse se produit tardivement, entre le 7^{ème} et le 10^{ème} jour après le début de la phase intra-érythrocytaire [11]. Ces formes circulantes, ingérées par le moustique femelle vecteur lors d'un futur repas sanguin chez un hôte infecté, vont initier une reproduction sexuée en se

différenciant en gamètes mâles et femelles dans la cavité abdominale du moustique pour ensuite fusionner et donner naissance à un ookinète. Cet œuf libre et mobile quittera la lumière du tube digestif du moustique pour se fixer sur la paroi externe de l'estomac et se transformer en oocyste. La centaine de sporozoïtes produits à l'intérieur de l'oocyste migreront jusqu'aux glandes salivaires de l'anophèle pour être libérés lors d'un prochain repas sanguin.

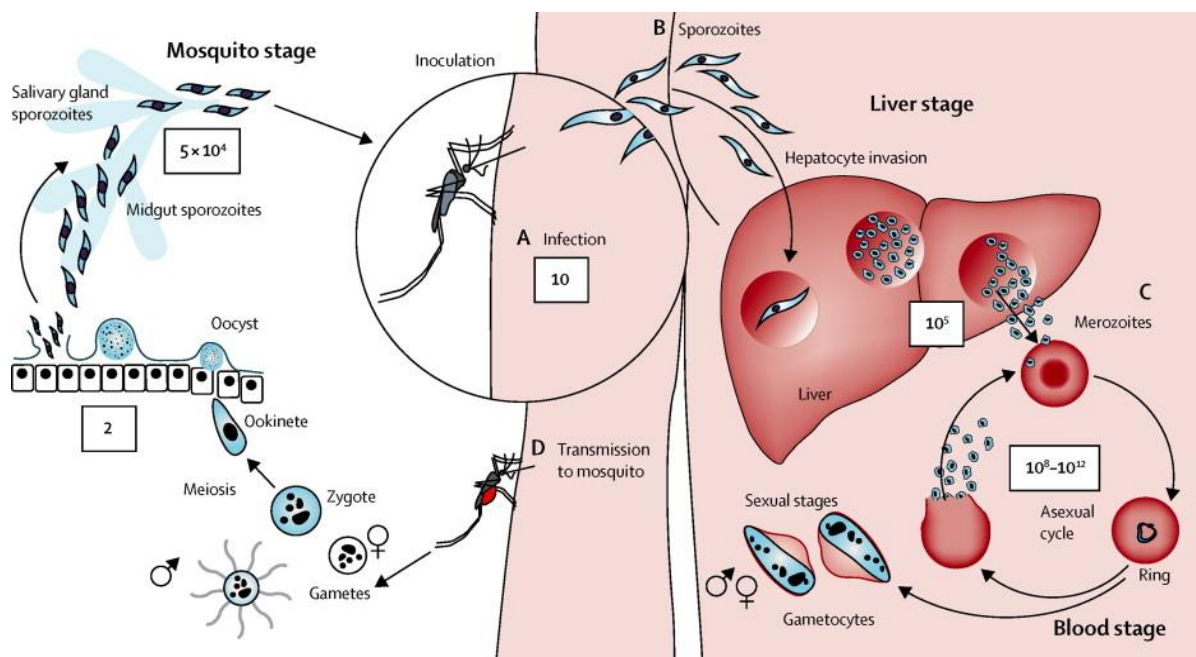


Figure 2 : Cycle parasitaire de *Plasmodium falciparum* [11].

2. Épidémiologie du paludisme

a. Épidémiologie mondiale

Le paludisme représente la première maladie parasitaire mondiale et le troisième fléau mondial après l'infection par le VIH et la tuberculose (Figure 3). Il se répartit sur toute la zone intertropicale découpée en trois principales zones de forte transmission : l'Afrique subsaharienne, l'Asie du Sud-Est et l'Amérique du Sud. Selon les dernières données de

l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [1], 3.3 milliards de personnes, répartis sur 97 pays, restent encore exposés au risque du paludisme en 2013. Même si de gros efforts ont déjà été réalisés pour faire reculer cette infection, objectifs par une diminution de la transmission et du nombre de cas et de décès dans certaines régions, 198 millions de cas de paludisme (124-283 millions) ont encore été estimés en 2013 (-40% de cas en 10 ans) dont 80% se déclarent en Afrique subsaharienne. Le nombre de morts associés sur cette même année est estimé à 584.000 décès (367.000-755.000 décès) dont 90% se localisent en Afrique subsaharienne et sont principalement dus à l'infection par *Plasmodium falciparum*. En zone d'endémie, ce sont les personnes fragilisées comme les enfants de moins de 5 ans, les femmes enceintes et les personnes âgées qui sont le plus durement atteints et chez lesquels la mortalité est la plus élevée.

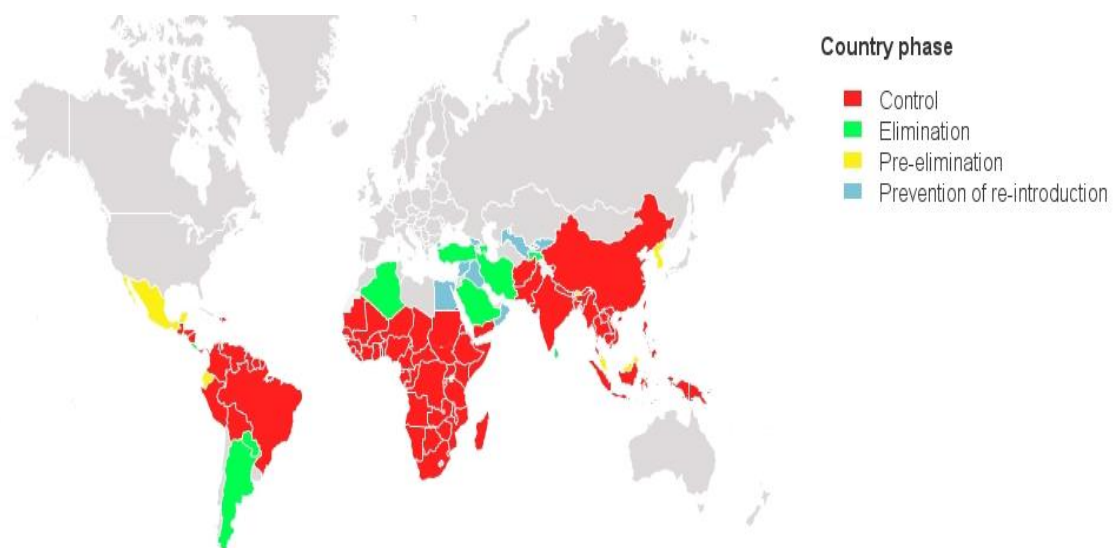


Figure 3 : Répartition mondiale de l'infection à *Plasmodium spp.*[12].

b. Epidémiologie du paludisme d'importation en France métropolitaine

L'augmentation des échanges touristiques et commerciaux entre les pays d'endémie palustre et les régions non endémiques expose désormais ces dernières au risque du paludisme par l'importation de cas. Environ 125 millions de voyageurs internationaux sont soumis chaque année au risque d'infection par *Plasmodium spp.* en visitant ces régions endémiques et cette exposition serait à l'origine de 10.000 déclarations d'accès palustre en zone non endémique encore appelés cas de paludisme d'importation [2].

De part son histoire récente d'empire colonial et un partage de la langue française avec des pays en zone d'endémie, il existe encore d'étroites relations économiques et un flux migratoire important entre la France et certains pays d'Afrique subsaharienne ou d'Asie du Sud-Est. Cet environnement fait donc de la France un pays tout particulièrement à risque d'importation de cas de paludisme. En 2013, le centre national de référence du paludisme (CNR) a recensé, à travers son réseau national, 2.171 cas notifiés de paludisme d'importation en France Métropolitaine ce qui permet d'estimer à environ 4.100 cas le nombre total d'accès palustre pour cette même année [4] faisant de la France le premier pays touché en Europe par le paludisme. Comme ce qui a pu être décrit dans les autres pays non endémiques [13], [14], la majorité des cas sont importés d'Afrique subsaharienne (96%) et sont dus essentiellement à *Plasmodium falciparum* (88%) [4]. Les formes graves de paludisme répertoriées en 2013 représentaient 12% des cas notifiés soit 267 formes graves. Le taux de mortalité est d'environ 0.46% pour l'ensemble des cas déclarés et de 3.7 % pour les cas graves [4].

La population concernée par le paludisme d'importation est hétérogène, composée de sujets d'origine africaine migrants de première génération et de deuxième génération nés en France de parents migrants, de voyageurs originaires de zones d'endémie et de voyageurs occidentaux, adultes ou enfants, tous considérés comme particulièrement à risque. En effet, les voyageurs et les expatriés originaires de zones non endémiques sont considérés comme

« naïfs » vis-à-vis du parasite et donc susceptibles de présenter une forme clinique grave d'infection à *Plasmodium falciparum*. Les migrants de première génération, les plus majoritairement retrouvés dans le cadre du paludisme d'importation [4], [13], [14], ayant déjà vécus en zone d'endémie et ayant déjà été infectés antérieurement par *Plasmodium falciparum*, ne conservent cependant pas leur statut immunologique de « semi-immun » en zone non endémique. La diminution de l'immunité 6 mois à 1 an après le départ de la zone de transmission palustre peut exposer les migrants au même risque de paludisme grave que les voyageurs [15]. De plus, la mauvaise compréhension du risque encouru par ces populations de migrants, reflétée par le non respect des recommandations prophylactiques, telles que l'absence de prise ou une prise irrégulière d'un traitement chimioprophylactique, augmente le risque d'un accès palustre au retour d'une zone d'endémie [13], [14], [16]–[18].

3. Les différentes formes cliniques de l'accès palustre

a. Accès palustre grave

i. Définition de l'accès palustre grave selon l'OMS (score OMS)

La gravité de l'infection à *Plasmodium falciparum* est associée à un taux de mortalité élevé chez certaines populations considérées à risque comme les enfants, les personnes âgées, les voyageurs/expatriés ou toutes personnes ayant séjourné en zone d'endémie palustre sans chimioprophylaxie [17], [18], incitant l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à établir un score de gravité basé sur un ensemble de critères cliniques et biologiques. Chez un patient infecté, l'objectif de ce score est d'alerter les cliniciens, suite à une évaluation simple, de la survenue potentielle d'un accès palustre grave défini par l'association de formes asexuées circulantes de *Plasmodium falciparum* et d'au moins l'un de ces critères cliniques et/ou biologiques. Un premier score de gravité de l'OMS publié en 1990 [19] établissait une liste de critères cliniques et biologiques classés en majeurs ou mineurs dans la survenue d'un accès grave. Cette classification fut par la suite révisée en 2000 [20] faisant la distinction entre

l'accès palustre grave rencontré chez l'adulte et chez l'enfant. De plus, une valeur pronostique et une estimation de la fréquence (+ à +++) ont été déterminées pour chaque critère clinique et biologique de ce score [21]. L'ensemble de ces critères est présenté dans le tableau 1 et le tableau 2 respectivement pour l'adulte et pour l'enfant.

Tableau 1 : Critères de gravité cliniques et biologiques dans l'accès palustre grave chez l'adulte selon la définition de l'OMS révisée en 2000 [20], [21].

Pronostic	Critères cliniques ou biologiques	Fréquence
(?) ^a	Prostration : en règle, extrême faiblesse	+++
+	Troubles de la conscience : score de Glasgow modifié ^b < 10	++
+++	Détresse respiratoire : définition clinique seulement chez l'enfant	+
++	Convulsions répétées : au moins 2 par 24 h	+
+++	État de choc : pression artérielle systolique < 80 mmHg en présence de signes périphériques d'insuffisance circulatoire	+
+++	Œdème pulmonaire (radiologique) : anomalies précisées chez l'enfant	+
++	Saignement anormal : définition purement clinique	+
+	Ictère : clinique ou bilirubine totale > 50 µmol/l	+++
+	Hémoglobinurie macroscopique	+
+	Anémie profonde : hémoglobine < 5 g/dl, hémocrite < 15 %	+
+++	Hypoglycémie : glycémie < 2,2 mmol/l	++
+++	Acidose : pH < 7,35 ou bicarbonates < 15 mmol/l	++
+++	Hyperlactatémie : lactates veineux plasmatiques > 5 mmol/l	++
++	Hyperparasitémie : notamment parasitémie ≥ 4 % chez le non immun	+
++	Insuffisance rénale : créatininémie > 265 µmol/l + diurèse < 400 ml/j	+++

^a Pas de données disponibles.

^b Le score de Glasgow modifié maximal est de 14 au lieu de 15 par suppression de l'*item* « réponse motrice non orientée à la douleur ».

Tableau 2 : Critères de gravité cliniques et biologiques de l'accès palustre grave chez l'enfant selon la définition de l'OMS de 2000 [20], [21].

Critères	Fréquence	Valeur pronostique
Cliniques		
- Coma (score de Glasgow ^a < 11)	+++	+++
- Troubles de conscience ^b (score de Glasgow < 15 et > 10)	+++	+++
- Convulsions répétées ^b (> 1/24 heures)	+++	+
- Prostration ^b	+++	+
- Syndrome de détresse respiratoire ^b (battement continu des ailes du nez, dépression inspiratoire franche de la base du thorax, dyspnée d'acidose de Küssmaul)	+++	+++
- Ictère ^b	+	++
- Défaillance cardiocirculatoire (PAS < 60 mmHg avant 5 ans, PAS < 80 mmHg après 5 ans, signes d'insuffisance circulatoire périphérique)	+	+++
- Saignement anormal ^b	+/-	+++
- Œdème pulmonaire (radiologique : majoration des structures interstitielles, syndrome interstitiel périhilaire, images alvéolaires avec bronchogramme aérien, images en aile de papillon, lignes de Kerley B avec ou sans épanchement pleural) ^b	+/-	+++
- Hémoglobinurie macroscopique	+/-	+
Biologiques		
- Hypoglycémie (< 2,2 mmol/l)	+++	+++
- Acidose métabolique ^b (bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L ou excès de base < -10, acidémie : pH < 7,35)	+++	+++
- Anémie grave ^b (Hb < 5 g/dl ou Ht < 15 %)	+++	+
- Hyperlactatémie (> 5 mmol/l)	++	+++
- Hyperparasitémie (\geq 4 % chez le sujet non immun, ou \geq 20 % chez le sujet semi-immun)	+	+/-
- Insuffisance rénale ^b (diurèse < 12 ml/kg/24 heures ou créatininémie élevée pour l'âge)	+	++

^a Score de Glasgow (3-15).

^b Critères ajoutés ou modifiés en 2000.

ii. Facteurs de gravité dans le contexte de paludisme d'importation

Même si la mise en place de ce score de gravité de l'OMS a permis d'améliorer la prise en charge des cas de paludisme, en zone d'endémie notamment, le choix de ces critères cliniques et biologiques présente néanmoins des limites. La non-spécificité de certains paramètres cliniques et biologiques, communs à d'autres infections communautaires des régions endémiques et non endémiques palustres, peut être à l'origine d'erreurs diagnostiques ou d'une minimisation de l'atteinte si on est en présence d'une coinfection bactérienne [22]. De plus, la plupart de ces marqueurs clinico-biologiques de gravité ont été évalués lors d'études menées sur des populations vivant en zones d'endémie et exposées en continue au parasite. La transposition de ce score de gravité de l'OMS dans un contexte de paludisme grave d'importation est donc à prendre avec précaution, posant la question de la nécessité de redéfinir avec précision l'accès palustre grave en dehors de zones d'endémie pour optimiser la prise en charge des patients et améliorer les critères d'inclusion lors d'études cliniques [21], [22].

De très nombreuses études cliniques et épidémiologiques ont ainsi été réalisées sur des cohortes de patients diagnostiqués pour une infection par *Plasmodium falciparum* dans le cadre du paludisme d'importation [5]–[7] ou plus spécifiquement sur des populations de patients hospitalisés dans des unités de soins intensifs [23]–[27]. L'objectif de ces études était de pouvoir identifier des facteurs de risque de l'accès palustre grave ou des signes cliniques et/ou biologiques associés à la mortalité. Malgré des schémas d'études et des populations différentes, certains facteurs semblent néanmoins fréquemment impliqués dans la survenue d'un accès grave tel que l'âge du patient [5]–[7], [23], les patients non originaires d'une zone d'endémie [5]–[7], [25], [27], l'absence de chimioprophylaxie [6], [17], [18], l'allongement du délai de prise en charge [6], [7] ou la zone d'endémie visitée [6], [7]. D'autres facteurs sont fortement associés au décès du patient comme une atteinte neurologique [23]–[27], une

acidose métabolique [23], [25]–[27], un œdème pulmonaire [24], [26], [27] et une forte parasitémie [5], [23], [25] lors de la prise en charge.

iii. Atteinte neurologique ou neuropaludisme (accès pernicieux)

Le neuropaludisme ou « accès pernicieux » regroupe toutes les manifestations neurologiques qui font suite à une atteinte du système nerveux central lors d'un accès palustre. Cette forme clinique est principalement rencontrée chez les patients considérés comme non immuns vis-à-vis du parasite c'est-à-dire les enfants de moins de 5 ans en zone d'endémie mais également les voyageurs/expatriés adultes et enfants dans le cadre du paludisme d'importation [28]. Le neuropaludisme se caractérise par l'apparition progressive de troubles de la conscience, d'une prostration ou de tous autres signes de dysfonctionnements neurologiques associés à une fièvre élevée et à un syndrome pseudo-grippal. Les troubles de la conscience vont de la simple obnubilation au coma profond, le plus généralement calme. L'atteinte neurologique peut dans certains cas se présenter de manière plus brutale avec un tableau clinique composé d'une fièvre très élevée et d'un coma accompagné de convulsions. Ces convulsions peuvent être inaugurales, généralisées ou localisées, plus ou moins espacées ou réalisées un état de mal épileptique. Pour être retenues en tant que signes de gravité du paludisme, les convulsions doivent être répétées au moins 2 fois par 24 heures chez l'adulte et 1 fois par 24 heures chez l'enfant [20], [21]. Cette présentation est plus fréquemment rencontrée chez les enfants que chez les adultes. Des formes d'hypotonie musculaire avec abolition des réflexes ostéotendineux peuvent également être observées. Dans un tableau clinique d'accès grave, l'atteinte neurologique peut être seule ou associée à d'autres atteintes viscérales (rein, poumons, foie) traduisant alors un état de choc avec défaillance multi viscérale.

En l'absence de traitement, l'évolution est rapidement mortelle en 2 à 3 jours. Même après introduction d'un traitement, la mortalité reste élevée et comprise entre 4 et 25% selon les

études réalisées sur des cohortes de patients de réanimation dans le cadre du paludisme d'importation [23]–[27]. Très rarement, des séquelles neurologiques peuvent être observées surtout chez les enfants.

iv. Autres formes graves non neurologiques

- En dehors de l'atteinte neurologique au cours de l'accès palustre, d'autres formes graves non neurologiques sont décrites. Le tableau de choc avec défaillance multi viscérale sans signes neurologiques ou l'atteinte isolée d'organes telle que l'insuffisance rénale aiguë organique, la détresse respiratoire ou la cytolyse hépatique sont des formes cliniques le plus souvent décrites chez les adultes dans les cas d'importation. Ces atteintes sont généralement associées à une acidose métabolique accompagnée ou non à une hyperlactatémie (lactates > 2.2 mmol/l ou à *fortiori* >5 mmol/l) reflet de l'hypoxie tissulaire. Au même titre que le neuropaludisme, le choc, l'acidose métabolique et la défaillance d'organes sont associés à un fort risque de mortalité chez les populations de voyageurs [23]–[27].
- L'anémie sévère (hémoglobine < 5g/dl) est un critère biologique de gravité extrêmement fréquent en zone d'endémie palustre, notamment chez les jeunes enfants âgés de moins de 2 ans. Dans le cadre du paludisme d'importation, l'anémie sévère, plus rarement décrite chez les enfants, n'est présente que dans 20% des cas d'accès grave [28]. Chez l'adulte, cette complication est très peu fréquente qu'elle soit isolée ou associée à d'autres critères de gravité.
- Enfin, d'autres formes considérées comme graves selon le score de gravité de l'OMS mais associées à une faible mortalité, peuvent également être rencontrées à une fréquence importante dans le cadre du paludisme d'importation : on distingue notamment l'hyperparasitémie isolée fébrile associée ou non avec un ictère clinique

et/ou biologique. L'hémoglobinurie, l'hypoglycémie ou la présence d'un saignement spontané sont par contre peu fréquents dans les formes graves d'importation [21], [24], [26], [27].

b. Accès palustre simple

C'est la forme clinique la plus fréquemment rencontrée dans le cadre du paludisme d'importation chez l'enfant et le voyageur non immun. Après une période d'incubation variable (de plusieurs jours à 1 an maximum), correspondant au délai entre la piqûre d'anophèles et la fin de la phase hépatique asymptomatique (généralement entre 7 et 12 jours pour *Plasmodium falciparum*) et pouvant être modulée par la prise de chimioprophylaxie ou l'immunité résiduelle du patient [29], l'accès palustre de « primo-invasion » se caractérise par un syndrome pseudo-grippal composé par une fièvre progressivement croissante, des frissons, des céphalées, des myalgies, des arthralgies, d'une toux, d'une dysphagie et des troubles digestifs à type d'anorexie, de nausées, de vomissements, de douleurs abdominales et même de diarrhées [3], [21], [29]. L'absence possible de fièvre chez certains patients ne permet pas d'exclure le diagnostic, bien que 80% des patients relatent quand même une histoire de fièvre les jours précédents la consultation. La présence d'une splénomégalie est inconstante à ce stade de l'infection. Ce tableau clinique dit « d'embarras gastrique fébrile », complètement non spécifique, rend le diagnostic difficile majorant le risque d'égarements diagnostiques et dans un deuxième temps, la possibilité de passer de cet « accès simple » en un « accès grave » d'évolution rapidement défavorable en l'absence de traitement [3], [21], [29]. Aucun argument clinique, biologique ou épidémiologique n'est actuellement disponible pour identifier le passage de la forme clinique non compliquée à la forme grave.

c. Forme clinique atypique : accès palustre chez la femme enceinte

L'accès palustre chez la femme enceinte est rare en France métropolitaine (environ 45 cas répertoriés en France en 2013 [4]) mais doit néanmoins systématiquement être considéré comme une forme grave. Sa prise en charge constitue donc une urgence médicale au même titre que le neuropaludisme. Cette forme dite de « paludisme gestationnel » présente un double risque :

- La survenue d'un accès grave chez la mère, plus exposée à ce risque que la population générale au même âge surtout lors des premières grossesses. Cela se manifeste par une hyperparasitémie, une anémie sévère, une hypoglycémie ou un œdème pulmonaire aigu associés à un taux de mortalité élevé (proche de 50%) [11].
- Le risque d'avortement spontané ou d'accouchement prématuré lié à l'anémie générée par l'accès palustre et à l'accumulation des formes parasitaires dans la microcirculation placentaire qui limite les échanges mère-enfant et par conséquent la croissance intra-utérine du fœtus avec un retentissement sur le poids de naissance.

En zone d'endémie, le paludisme constitue encore une importante cause de surmortalité périnatale de la mère et de l'enfant.

4. Le diagnostic biologique du paludisme

a. Eléments d'orientation et principe de réalisation du diagnostic biologique

Devant l'absence de spécificité du tableau clinique de l'accès palustre de « primo-invasion » et le risque d'aggravation de cette forme clinique avec passage d'une forme simple à une forme grave, tout professionnel de santé doit garder à l'esprit que « **toute fièvre ou autre symptomatologie non spécifique de retour d'une zone d'endémie palustre doit faire évoquer un paludisme** ». La notion de voyage en zone d'endémie est donc une notion extrêmement importante qui doit systématiquement être évoquée par le clinicien lors de

l'interrogatoire d'un patient fébrile aux urgences. S'il y a une histoire de voyage dans les mois précédents, le clinicien pourra dans un deuxième temps chercher à obtenir des informations sur la zone d'endémie visitée ainsi que sur la prise de chimioprophylaxie qui sera utile à l'interprétation des résultats biologiques [29]. Cette hypothèse diagnostique devra obligatoirement être confirmée par un examen biologique pour mettre en évidence les formes asexuées circulantes du parasite dans le sang total. Le diagnostic biologique du paludisme est considéré comme une urgence médicale imposant, selon les recommandations de l'OMS, un rendu de résultats dans les 2 heures suivant le prélèvement [30].

Le prélèvement sanguin, nécessaire à la réalisation d'un diagnostic biologique de qualité, peut être capillaire ou devra être effectué sur un tube EDTA ou ACD s'il est veineux. Même si la quantité de parasites circulants peut varier dans le temps, il n'est pas nécessaire de prélever pendant le pic fébrile ou la phase de frissons du patient pour pouvoir observer les formes parasitaires [21]. Néanmoins, devant une recherche de paludisme négative avec une symptomatologie persistante évocatrice, d'autres prélèvements sanguins pourront être répétés 6 à 12 heures plus tard pour détecter d'éventuelles formes parasitaires et ainsi confirmer le diagnostic [21].

Différentes techniques diagnostiques existent pour la recherche de paludisme avec des performances analytiques variables qu'il faudra prendre en compte afin d'interpréter les résultats d'un diagnostic biologique du paludisme.

b. Le frottis sanguin

Le frottis sanguin effectué à partir d'un prélèvement de sang total et coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG) est la technique la plus fréquemment utilisée pour le diagnostic biologique du paludisme en zone d'endémie et dans un contexte d'importation. Cette technique présente de nombreux avantages : en effet, c'est une technique facile et rapide à réaliser qui permet à la fois l'identification morphologique de tous les stades parasitaires de

toutes les espèces de *Plasmodium spp.* et l'estimation de la parasitémie nécessaire à la prise en charge (critère de gravité) et au suivi de l'efficacité du traitement (cinétique de diminution de la parasitémie) (figure 4). Celle-ci est évaluée en estimant la proportion de globules rouges parasités sur un nombre de globules rouges totaux. Elle requiert néanmoins un personnel formé à l'identification microscopique des formes parasitaires et possède une limite de détection de 100-150 parasites/ μ l qui peut être à l'origine de faux négatifs pour de très faibles parasitémies [21].

La lecture d'un frottis sanguin pour la recherche de paludisme est considérée comme négative après une lecture de 200 champs microscopique de 200-250 globules rouges soit environ 40.000 hématies. Un résultat négatif après la lecture d'un frottis ne permet en aucun cas d'éliminer le diagnostic de paludisme si celui-ci n'est pas couplé à une autre technique.

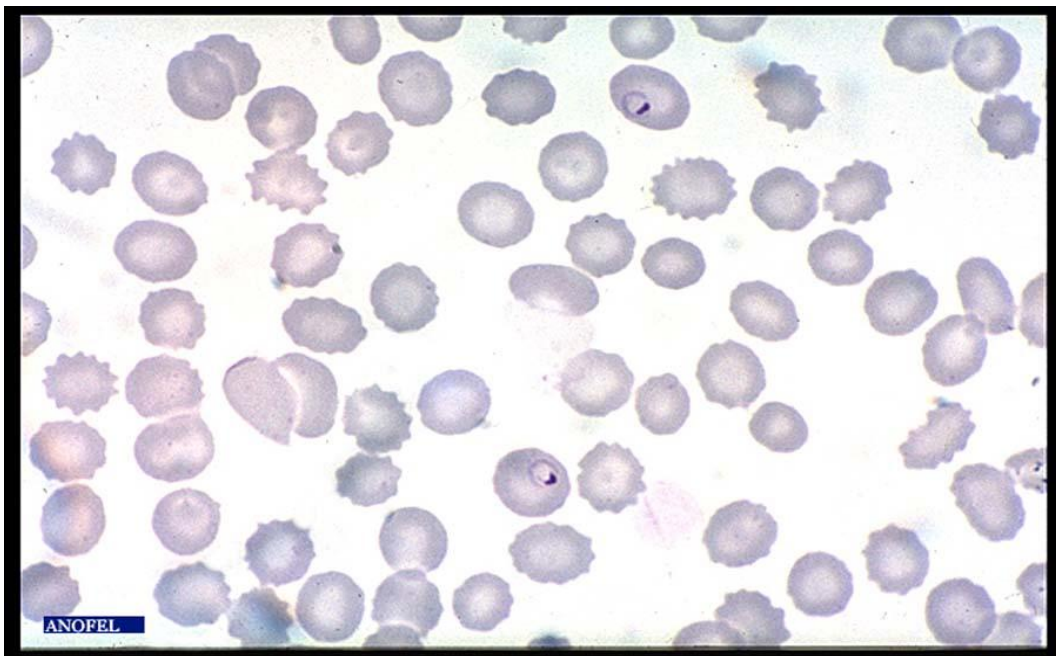


Figure 4 : Frottis sanguin : trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* (May-Grünwald-Giemsa) [31].

c. La goutte épaisse

La goutte épaisse est considérée comme le « gold standard » pour le diagnostic biologique du paludisme et elle peut être combinée au frottis sanguin. Cette technique diagnostique, dite de concentration, est plus sensible que le frottis sanguin pour détecter les formes parasitaires : en effet, après coloration au Giemsa, un plus grand volume de sang est examiné par champ microscopique par rapport au frottis (de 20 à 50 fois plus) [21], [29]. La coloration sans fixation de la goutte épaisse ayant pour conséquence la lyse des globules rouges, la quantité de parasite est alors évaluée par rapport au nombre de globules blancs et estimée en nombre de parasites pour 1.000 leucocytes (Figure 5). Malgré une limite de détection de 10 à 20 parasites/ μ l, la technique de goutte épaisse présente quelques limites : contrairement au frottis, c'est une technique plus longue à réaliser et qui nécessite une grande expérience à la lecture microscopique pour détecter les formes parasitaires. De plus, l'identification de l'espèce parasitaire sur une goutte épaisse est parfois très difficile et peut nécessiter une technique complémentaire pour finaliser le diagnostic.

d. Les tests de diagnostics rapides (TDR)

De par leur rapidité et simplicité d'exécution et d'interprétation, leur sensibilité et leur spécificité, les tests de diagnostic rapide du paludisme sont devenus des techniques de plus en plus utilisées en zone d'endémie et dans le cadre du paludisme d'importation. Leur principe est basé sur la détection immunochromatographique d'antigènes circulants du parasite. Les principaux antigènes parasitaires détectés sont la protéine HRP2 (Histidine rich protein 2) spécifique de *Plasmodium falciparum*, l'enzyme pLDH (plasmodium lactate deshydrogenase) pan-malarique ou spécifique d'espèce et l'enzyme aldolase pan-plasmodiale.

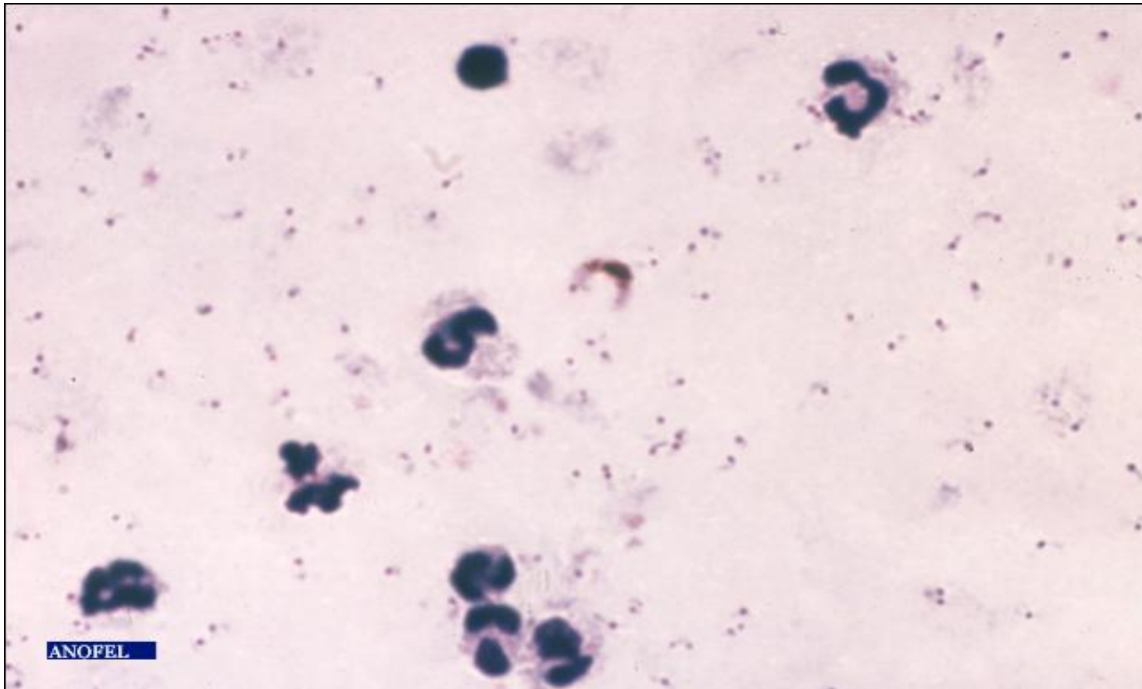


Figure 5 : Goutte épaisse avec gamétocytes et trophozoïtes de *Plasmodium falciparum* (Giemsa) [32].

L'HRP2 est une protéine produite spécifiquement par *Plasmodium falciparum* au niveau de la vacuole digestive et du cytoplasme du parasite mais elle est également présente dans la membrane érythrocytaire. HRP2 serait utilisée par *Plasmodium falciparum* pour la polymérisation de l'hème en vue de sa détoxification et est libérée lors de la rupture du schizonte [33]–[35].

La pLDH et l'aldolase pan-plasmodiale sont des protéines enzymatiques impliquées dans le métabolisme glycolytique du parasite et synthétisées par toutes les espèces de plasmodium et par tous les stades parasitaires (formes sexuées et asexuées). Certains isomères de la pLDH sont propres à certaines espèces et ils peuvent être spécifiquement recherchés par certains TDR permettant un diagnostic d'espèce approché pour *P.falciparum* et *P.vivax*. La détection de ces enzymes est souvent couplée à celle d'HRP2 dans la grande majorité des tests TDR.

Les performances analytiques de ces tests, souvent proches de celles du frottis avec une détection d'environ 100 parasites/ μ l, leur ont permis de devenir une alternative à la microscopie dans de plus en plus de centres diagnostiques mais ils doivent être combinés à une autre technique tel que le frottis pour le diagnostic biologique du paludisme. La sensibilité et spécificité de ces tests commerciaux sont souvent > 95 % mais varient selon le réactif, l'antigène détecté et la parasitémie [36], [37]. Il faut prendre en compte les limites de ces TDR : la longue demi-vie de ces molécules parasitaires circulantes (HRP2) entraîne une persistance de la positivité de ces tests jusqu'à 30 jours après la résolution de l'accès palustre. La présence du facteur rhumatoïde peut également être à l'origine de réactions faussement positives [3], [21]. A l'inverse, des réactions faussement négatives ont également été décrites avec certaines souches de *Plasmodium falciparum* localisées en Amérique du Sud délétées en HRP2 [3]. La détection des espèces de *P.ovale* et *P.malariae* est également insuffisante pour certains kits testés (pLDH et aldolase) contrairement à *P. falciparum* et *P.vivax*. Cette faible sensibilité pour les espèces *P.ovale* et *P.malariae* est liée à la faible parasitémie associée ainsi qu'à une faible production d'aldolase et de pLDH [38]. Un phénomène de prozone a également été décrit, responsable de réactions faussement négatives notamment avec l'antigène HRP2 [39]. Enfin, ces dispositifs diagnostiques sont chers par rapport aux techniques microscopiques et ne permettent pas d'estimer une parasitémie. Par conséquent, un résultat négatif avec ces tests ne peut en aucun cas suffire à éliminer un diagnostic de paludisme et devra être complété par un examen microscopique [36].

e. La détection à l'acridine orange

Le test diagnostique du QBC malaria® (Quantitative Buffy Coat) est une technique diagnostique dite de concentration du sang total dans un dispositif capillaire après centrifugation. La détection du parasite est basée sur la fluorescence des formes parasitaires en vert (ADN nucléaire) et rouge (ARN cytosolique) après incorporation de molécules

d'acridine orange, intercalant des acides nucléiques, qui tapissent la paroi interne du capillaire (Figure 6). Cette technique rapide est aussi sensible que la goutte épaisse dans le diagnostic du paludisme avec une limite de détection de l'ordre de 10 parasites/ μ l et une valeur prédictive positive proche de 100% [40]. Il existe néanmoins certains inconvénients à cette technique. Le QBC malaria® est un dispositif onéreux qui requiert un matériel spécifique pour la préparation des échantillons (centrifugeuse à capillaires) et leur lecture (objectif X 60 à l'immersion avec une encoche latérale pour y insérer une lampe à fluorescence) [40]–[42]. La lecture du QBC malaria® ne permet pas de déterminer l'espèce infectante ni la parasitémie; la reconnaissance des formes parasitaires circulantes et leur distinction avec des artéfacts fluorescentes nécessitent une expérience qui est limitée à certains laboratoires spécialisés [21], [40]–[42]. De part sa rapidité d'exécution et sa valeur prédictive positive, le QBC malaria® représente un bon test diagnostique de première intention mais il devra obligatoirement être confirmé par la lecture d'un frottis pour l'identification de l'espèce et l'estimation de la parasitémie [40].

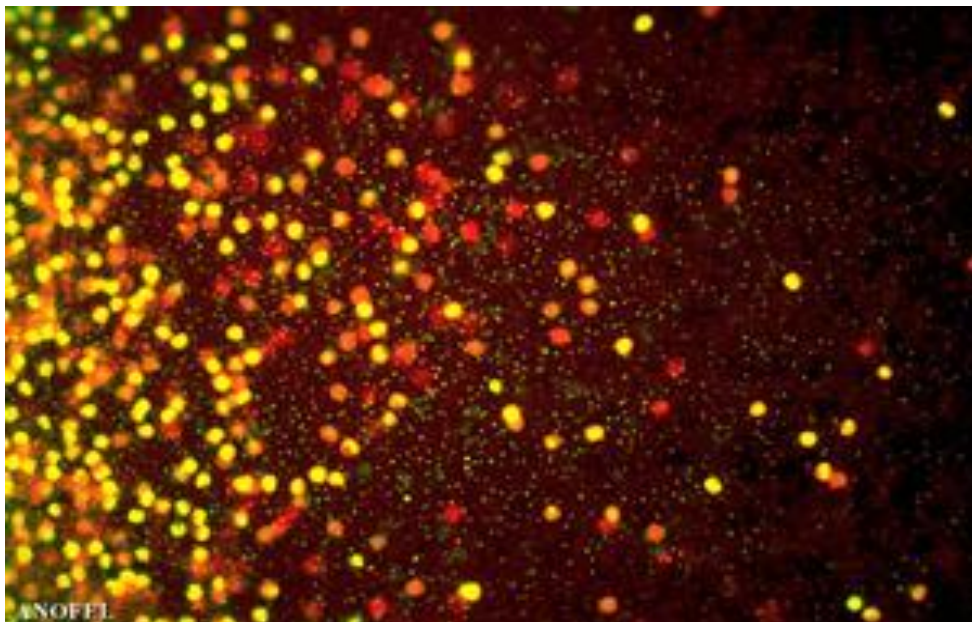


Figure 6 : Trophozoïtes fluorescents avec la technique du QBC [43].

f. Diagnostic biologique par amplification génique (PCR)

Le diagnostic du paludisme par biologie moléculaire, dont la mise en œuvre est encore réservée à certains laboratoires spécialisés, s'est considérablement développé depuis la fin des années 80 dans le but de pallier aux limites techniques et analytiques du frottis sanguin et de la goutte épaisse, techniques « gold standard » considérées comme longues, fastidieuses et peu sensibles.

D'abord développées selon une méthode « nichée » en point final avec révélation des produits de PCR sur gel d'agarose, les premières techniques d'amplification PCR ont rapidement montrées leur supériorité par rapport aux techniques microscopiques dans le diagnostic du genre *Plasmodium spp.* [27] et de l'espèce avec une différenciation des 4 espèces impliquées à l'époque [44], [45]. Ces PCR, bien que très efficaces pour l'identification d'espèce, la détection de faibles quantités de parasite et la révélation de coinfections par plusieurs espèces plasmodiales, ne répondent pas à tous les pré requis pour le diagnostic de paludisme : ces méthodes de PCR nichée (*nested-PCR*) restent longues à réaliser et le risque de résultats faussement positifs par contamination inter échantillons par des amplicons post-PCR est très élevé. Aucune estimation de la parasitémie n'est également possible avec ces techniques en point final.

Le développement des techniques de PCR en temps réel a par la suite permis d'améliorer le diagnostic du paludisme par biologie moléculaire en raccourcissant les délais de rendu de résultats, en limitant les risques de contamination inter échantillons par l'utilisation de système analytique clos potentiellement automatisable et en permettant une quantification parasitaire absolue par l'utilisation d'une gamme standard du génome parasitaire ou du gène cible sous forme plasmidique à différentes dilutions [46]. Les réactions mises en œuvre à l'heure actuelle ciblent principalement le gène 18S ribosomal spécifique de *Plasmodium spp.* et reposent sur une détection d'émission de fluorescence spécifique, reflet de l'amplification

génique, type SYBR green® ou Taqman®. L'utilisation de différents marqueurs de fluorescence pour la détection de l'amplification PCR au cours de la réaction a favorisé par la suite le développement de PCR « multiplex » en temps réel qui a permis la détection simultanée de toutes les espèces plasmodiales en une seule réaction facilitant la détection des coinfections [47], [48].

L'ensemble de ces techniques en temps réel détecte jusqu'à 1 parasite/ μ l avec une sensibilité et une spécificité variable selon les gènes cibles et la méthodologie employée mais souvent proche de 100% [38], [49]–[51]. Néanmoins, même si la supériorité analytique de la PCR en temps réel a été largement validée par différentes études, elle reste difficilement applicable au diagnostic biologique de routine du paludisme. Les délais de prise en charge et de rendu de résultat (3 heures environ) ne satisfont toujours pas les exigences de l'OMS [30], les différents stades parasitaires présents ne peuvent pas être différenciés, le coût du test est plus élevé que pour la microscopie et la persistance d'ADN plasmodial circulant après traitement de l'accès palustre sont des contraintes à son utilisation en routine. De plus, la nécessité de locaux appropriés et d'appareillages spécifiques limitent son accès à des petites structures non spécialisées. Cependant, la PCR pour le diagnostic biologique du paludisme est très utile en complément de la microscopie car elle permet la détection et l'estimation de très faibles quantités de parasites circulants, l'identification ou la confirmation d'espèce en cas de doute ou d'incapacité à identifier le parasite par microscopie et enfin la discrimination des espèces en cas d'infections mixtes [38], [49], [51].

g. Les autres marqueurs biologiques d'orientation associés à l'accès palustre

De nombreuses études cliniques ont été menées dans l'objectif de pouvoir identifier des marqueurs biologiques spécifiques de l'accès palustre ou prédictifs de la survenue d'un accès grave et ainsi simplifier le diagnostic biologique du paludisme. Une corrélation entre une

thrombopénie et une anémie a été montrée avec la présence de *Plasmodium falciparum* mais reste inconstante, non spécifique de cette infection et peu prédictive d'un accès grave. Néanmoins, une étude récente réalisée en Papouasie-Nouvelle-Guinée a démontré une forte association entre l'intensité de la thrombopénie détectée lors d'un accès palustre grave à *Plasmodium falciparum* et le risque de mortalité associé [52]. Cette étude relance donc l'intérêt de la quantification rapide des plaquettes et de l'évaluation de l'intensité de la thrombopénie chez les patients impaludés, d'autres travaux sont encore nécessaires pour étayer ces observations.

L'hyperleucocytose, reflet d'un processus inflammatoire, reste inconstant au cours de l'accès palustre et ne constitue en aucun cas un marqueur du paludisme. La protéine C réactive (CRP), dans un contexte de fièvre de retour de voyage en zone d'endémie, a montré un intérêt dans la discrimination entre des patients atteints de paludisme et un groupe contrôle [53]. Ce paramètre reste cependant non spécifique et peu prédictif de l'accès grave. La procalcitonine (PCT), précurseur peptidique de l'hormone calcitonine, est un marqueur biologique reconnu des infections bactériennes aiguës systémiques qui a également été évalué lors d'accès palustre simple et grave dans le cadre du paludisme d'importation. Une augmentation de la concentration de PCT a été observée lors d'accès palustre grave et corrélée avec la parasitémie à l'admission, ce qui a été en faveur de son utilisation pour différencier rapidement les cas d'accès palustre grave et simple [54], [55]. Cependant, la forte variation de sensibilité de ce marqueur en fonction du seuil de positivité fixé lors de l'étude et la possible augmentation de la concentration de PCT lors d'infections palustre à non-*falciparum* ou lors de co-infections bactériennes à limiter son utilisation pour le paludisme [54], [55].

Le dosage de l'HRP2 plasmatique, meilleur reflet de la biomasse parasitaire que la parasitémie, a été réalisé dans des cohortes de patients adultes en Asie du Sud-Est [56] et chez des enfants en Afrique [57], [58]. Une forte corrélation entre le niveau d'HRP2 circulant et la

gravité de l'accès palustre a été montrée dans ces populations. Le dosage des taux d'HRP2 plasmatiques chez des patients atteints de paludisme grave, de paludisme simple ou de formes asymptomatiques a permis de déterminer qu'une concentration > 1000 ng/ml est en faveur d'un accès grave avec une sensibilité de 99% et qu'une concentration < 200ng/ml ne permettait pas d'incriminer le paludisme comme étiologie du tableau clinique [59]. D'autres études réalisées en zone d'endémie se sont intéressées au rôle prédictif de la concentration plasmatique initiale en HRP2 à l'admission dans la progression vers un neuropaludisme. Dans cette cohorte, une concentration de 3500 ng/ml d'HRP2 serait prédictive, lors de la prise en charge, de la survenue d'une atteinte neurologique [60]. Ce marqueur n'est encore qu'un outil de recherche actuellement et est peu appliqué dans le diagnostic du paludisme en routine. D'autres études menées sur le paludisme d'importation sont nécessaires pour valider son utilisation dans la pratique médicale. La combinaison entre la détermination de la concentration d'HRP2 et la quantification d'ADN parasitaire circulant a permis d'affiner la définition de l'accès palustre grave dans des populations en zone d'endémie en vue de futures recherches cliniques mais elle n'est pas, à l'heure actuelle, utilisée en routine dans la prise en charge du paludisme en zone d'endémie ni dans le cadre du paludisme d'importation [61].

h. Diagnostic biologique indirect : la sérologie anti-palustre

La recherche d'anticorps spécifiquement dirigés contre *Plasmodium spp.* dans le sérum repose sur de nombreuses techniques immunologiques, dont la technique de référence reste l'immunofluorescence indirecte. Cette technique de détection des anticorps totaux par un conjugué anti-immunoglobulines humaines fluorescent est réalisée le plus souvent avec des plasmodiums, au stade schizonte, comme principale source d'antigènes figurés intra-érythrocytaires. Les espèces de plasmodium les plus souvent utilisées pour la préparation des antigènes sont *Plasmodium cynomolgi* à partir d'une infestation de singes macaques en laboratoire ou des souches de laboratoire de *Plasmodium falciparum*, cultivées en hématies

humaines *in vitro* dont les communautés antigéniques permettent de détecter les anticorps dirigés contre *Plasmodium spp.* [62]. Cette technique, sensible, spécifique et facilement réalisable est néanmoins soumise à une interprétation subjective dépendante de l'expérience de l'opérateur qui fait la lecture au microscope à fluorescence de la fixation des anticorps marqués [62].

De part les pré requis indispensables au diagnostic du paludisme liés à l'urgence médicale qu'il représente, la sérologie anti-palustre ne constitue en aucun cas un test diagnostique de première intention pour une recherche de paludisme lors d'un accès aigu. Les indications de la sérologie anti-palustre sont limitées à 3 situations : le diagnostic rétrospectif pour des patients traités pour un paludisme et pour lesquels aucune forme parasitaire circulante n'a été préalablement détectée, l'identification de porteurs asymptomatiques ayant séjourné en zone d'endémie dans le cadre de la prévention du paludisme post transfusionnel et enfin lors d'études séro-épidémiologiques en zone d'endémie afin d'évaluer l'exposition des populations au parasite et contrôler l'efficacité des campagnes d'éradication [62]. L'utilisation de l'immunofluorescence indirecte pour évaluer l'immunité anti-palustre reste controversée, mais cependant, la sérologie évolue parallèlement à l'âge et à l'acquisition d'une immunité protectrice. A l'inverse, il est difficile de mettre en évidence des anticorps protecteurs parmi ce mélange d'anticorps détectés sur schizontes entiers intra-érythrocytaires [62].

De nouvelles techniques sérologiques immunoenzymatiques ont par la suite été développées telles que l'ELISA pour suppléer l'immunofluorescence indirecte, technique qui n'était pas à la portée de tous les laboratoires notamment pour le maintien de souches de plasmodium en culture et peu adapté aux grosses cadences d'analyses. Ces techniques ELISA, contenant un ou plusieurs antigènes figurés spécifiques de *Plasmodium spp.*, ont démontré des performances équivalentes à l'immunofluorescence indirecte dans certaines études [63].

II. Physiopathologie de l'accès palustre grave

La survenue d'un accès palustre grave résulte d'un processus multifactoriel complexe faisant intervenir de nombreux mécanismes liés à l'hôte et au parasite. Deux évènements semblent néanmoins majoritaires et abondamment décrits dans la littérature : la séquestration parasitaire et les mécanismes immunopathologiques associés au déséquilibre entre réponse immunitaire innée pro- et anti-inflammatoire.

1. La séquestration parasitaire

La séquestration parasitaire est un des principaux mécanismes physiopathologiques de l'accès palustre grave à l'origine de l'atteinte cérébrale et du paludisme gestationnel. Résultant d'un phénomène, appelé « cytoadhérence », elle repose sur l'adhésion des globules rouges parasités à la surface des cellules endothéliales vasculaires de l'hôte, à la capacité du globule rouge parasité de s'agglutiner avec des globules rouges non parasités (*rosetting*) ainsi qu'à l'agglutination des globules rouges parasités facilitée par les plaquettes (*clumping*) (figure 7) via des protubérances à la surface de la membrane du GR appelées knobs. La séquestration parasitaire permet aux formes matures asexuées de *Plasmodium falciparum* (trophozoïtes âgés et schizontes) [64], contrairement à la forme sexuée gamétocytaire [65], de pouvoir échapper à la clairance splénique de l'hôte et favorise l'augmentation de la biomasse parasitaire par une multiplication facilitée dans l'environnement anaérobique des veinules post-capillaires. Ce processus de séquestration est indispensable au bon développement du parasite lui conférant un avantage pour sa survie contrairement aux autres espèces non-*falciparum* [66], [67].

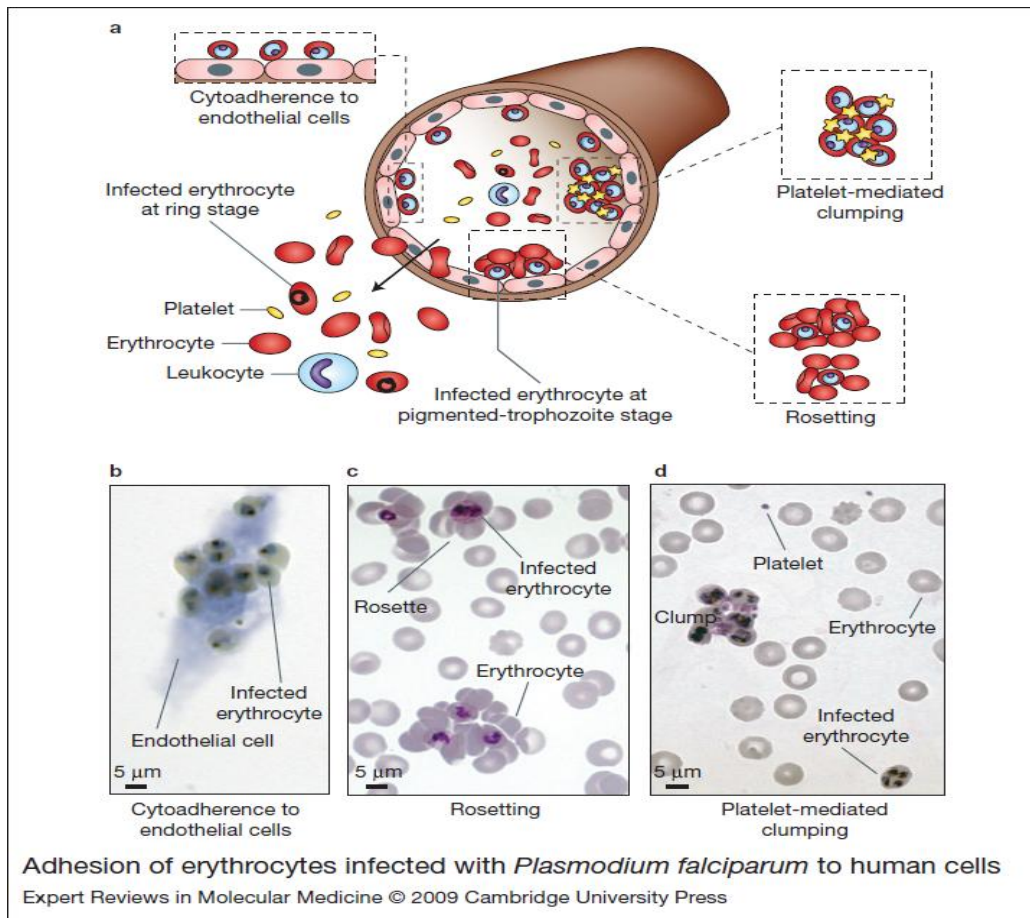


Figure 7 : Phénotypes d'adhérence impliqués dans le phénomène de séquestration parasitaire [68].

a. Formation des knobs

Le développement intra-érythrocytaire du parasite provoque 12 à 15 heures après l'invasion du GR une modification de la surface du globule rouge à l'origine de protubérances de 100μm de diamètre appelées knobs (figure 8) [11], [67].

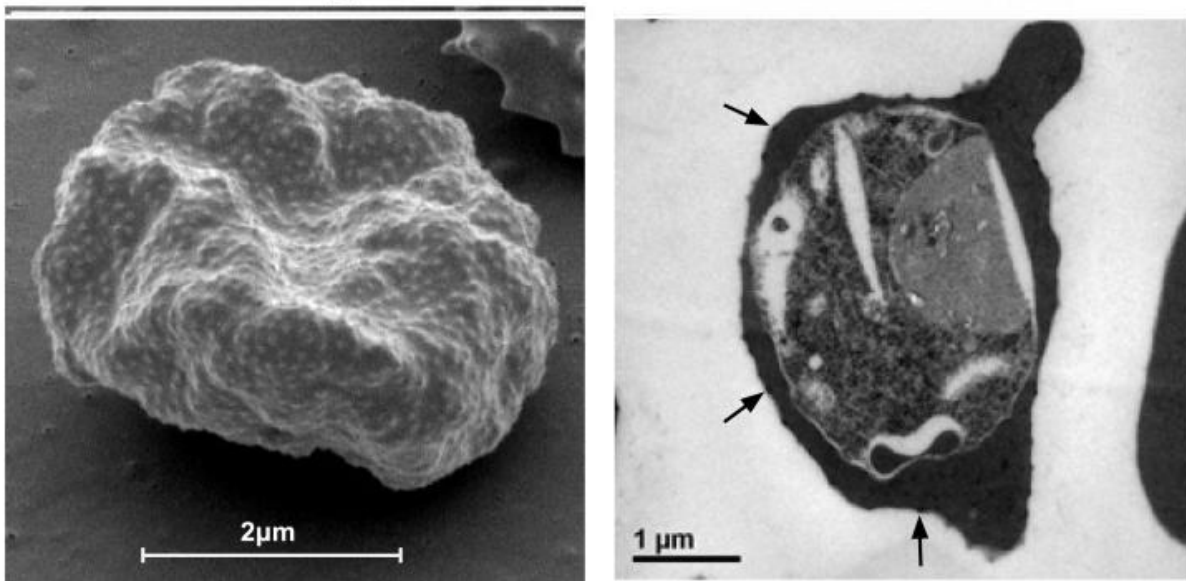


Figure 8 : Knobs à la surface du globule rouge parasité par microscopie électronique [69].

Cette structure de surface est constituée de protéines parasitaires exportées, majoritairement la Knob-Associated Histidine Rich Protein (KAHRP), mais également la *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 3 (PfEMP3), la Ring-infected Erythrocyte Surface Antigen (RESA) et la Mature Erythrocyte Surface Antigen (MESA ou PfEMP2) qui participent à son assemblage. KAHRP interagit avec les composants du cytosquelette du globule rouge tel que la spectrine et l'actine entraînant une modification de l'ensemble des propriétés physiques du globule rouge avec une augmentation de la rigidité du globule rouge parasité et une réduction de sa déformabilité par une diminution de son élasticité et une augmentation de sa taille [69], [70].

D'autres protéines synthétisées par le parasite et exportées à la surface de la membrane du globule rouge sont également présentes au niveau des knobs (Figure 9). Les antigènes variants de surface (*variants surface antigen*) (VSA) principalement composés par les RIFINs, STEVORs, SURFINs et *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) sont des structures polypeptidiques permettant de faire interagir les protubérances de surface

avec l'endothélium vasculaire ainsi qu'avec la surface d'autres globules rouges non parasités [67].

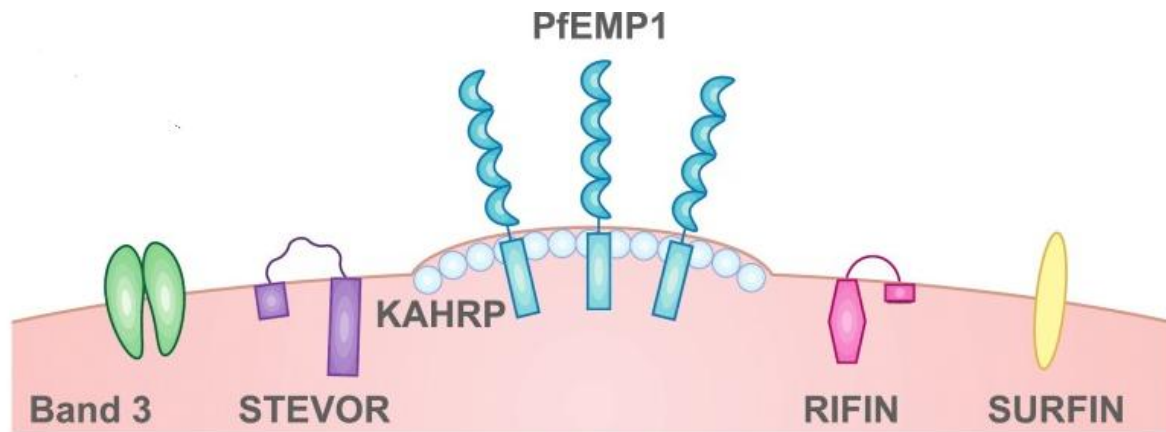


Figure 9 : Principales familles de protéines composant le groupe des VSA à la surface des globules rouges parasités [69].

Les knobs, dont la densité à la surface du globule rouge parasité varie en fonction des isolats et du stade parasitaire, peuvent être considérés comme un facteur de virulence de *Plasmodium falciparum* [71]. Cependant, ces structures ne sont pas indispensables à la cytoadhérence parasitaire : des modèles knobs knock out restent adhérents à l'endothélium vasculaire de part l'expression des protéines PfEMP1 et *Plasmodium malariae* exprime également des structures type knobs qui ne lui permette pas néanmoins de cytoadhérer [11], [67].

b. PfEMP1

PfEMP1 est une des protéines majoritaires des VSA, considérée comme le facteur de virulence majeur de *Plasmodium falciparum*, insérée dans les protubérances des knobs à la surface du globule rouge parasité [72], [73]. Cette famille de polypeptides présente un intérêt majeur dans la physiopathologie de l'accès grave puisqu'elle est directement impliquée dans les phénomènes de séquestration parasitaire par interaction avec des récepteurs de l'hôte à la

surface des cellules endothéliales [67]. Cette adhésion à la surface des globules rouges via PfEMP1 a été confirmée dans certaines hémoglobinopathies comme la drépanocytose, l'hémoglobinosose C et l'ovalocytose où la déformation des globules rouges liée à la maladie sous-jacente altère l'exposition de PfEMP1 à leur surface et par conséquent la séquestration parasitaire [70], [74].

PfEMP1 est un polypeptide parasite de haut poids moléculaire (200 à 400 kDa), sensible à la digestion trypsique, qui est inséré dans la membrane du globule rouge parasité. Sa structure typique est composée de 4 parties distinctes : un segment N terminal extracellulaire variable (NTS), une région de domaines protéiques variables qui interagit avec les récepteurs cellulaires, un domaine transmembranaire (TM) et un segment C terminal intracellulaire conservé (ATS) qui interagit avec la protéine KAHRP intra cytoplasmique [67], [69] (figure 10).

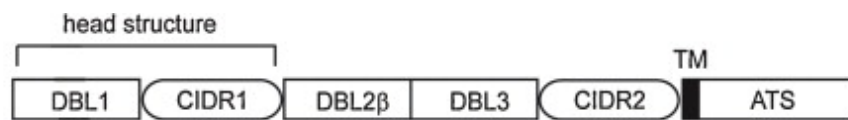
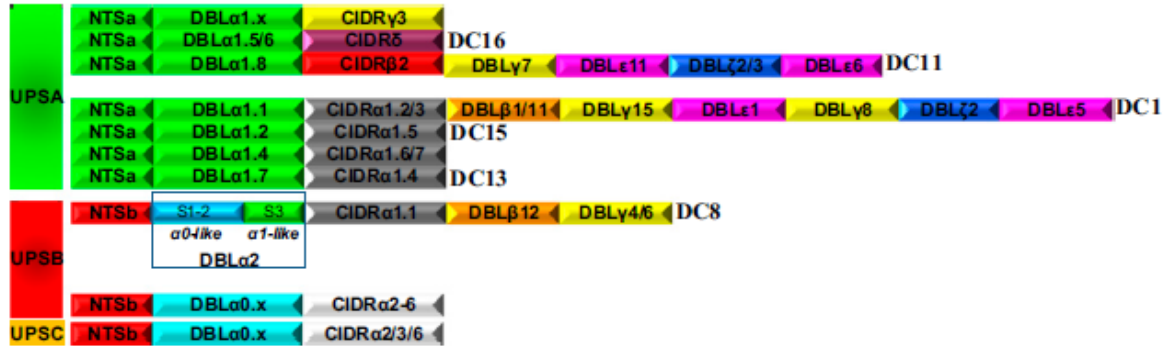


Figure 10 : Représentation schématique de différents domaines d'une protéine PfEMP1 [75].

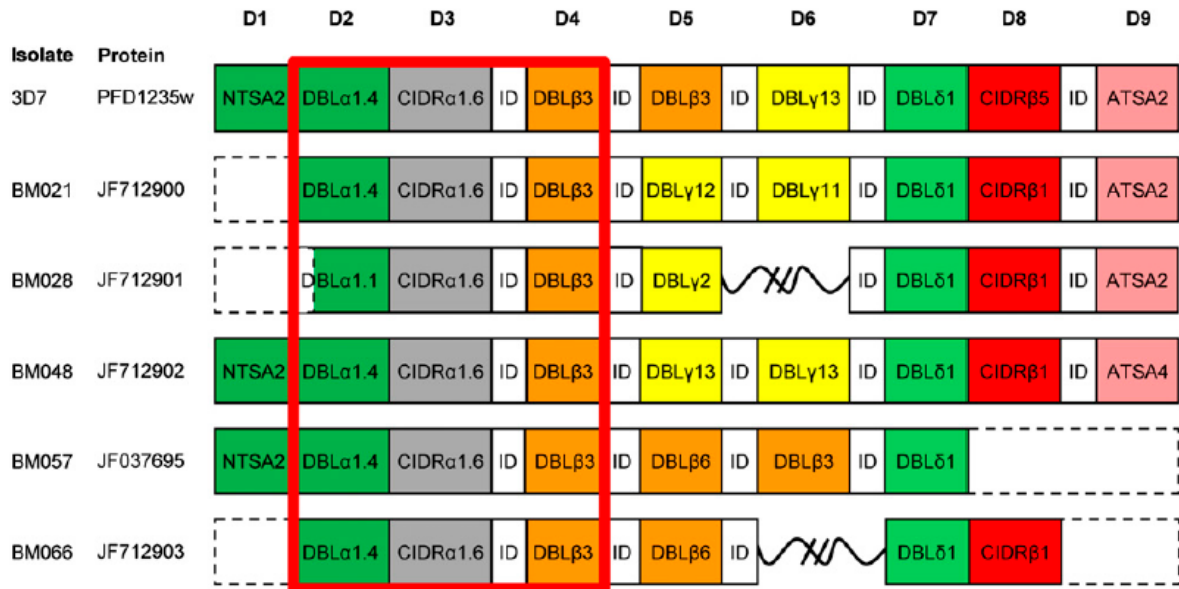
La région variable de PfEMP1 est composée d'une succession de domaines Duffy Binding-Like (DBL) entre lesquels sont intercalés des domaines Cysteine-Rich Interdomain Regions (CIDR) et d'un domaine C2. Les domaines DBL sont classés en 6 classes de séquences (α , β , γ , δ , ϵ et ζ) et les domaines CIDR en 4 classes de séquences (α , β , γ et δ), fonction de leur homologie, ainsi qu'en sous-classes (ex : $\alpha 1.1$). L'ordre de succession et le nombre de ces domaines extracellulaires varient en fonction des variants PfEMP1, ce qui est à l'origine

d'une très grande variabilité de séquences protéiques (moins de 50% d'homologies en acides aminés [75]) et qui peut avoir pour conséquence un profil de cytoadhérence variable entre les souches de *Plasmodium falciparum* ainsi qu'une possibilité d'échappement au système immunitaire de l'hôte [67]. Cependant, certains motifs protéiques semblent être conservés entre certains variants PfEMP1 tel que la tête de structure N-terminale semi-conservée NTS-DBL α -CIDR α ou le tandem DBL δ -CIDR β/γ reflétant une activité d'adhérence qui peut être commune pour plusieurs protéines [75], [76].

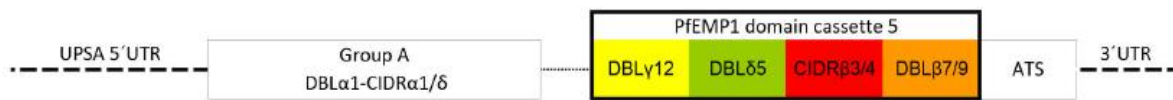
La forte variabilité des séquences protéiques de PfEMP1 limite les études classiques d'alignements permettant d'identifier des séquences protéiques conservées dans cette famille. Néanmoins, une large étude bioinformatique d'alignements de 399 séquences protéiques de PfEMP1, provenant de 7 génomes de souches *Plasmodium falciparum* de différentes régions géographiques, a identifié certains motifs protéiques conservés dans ces molécules PfEMP1 [77]. Ces motifs protéiques ou domaine cassette (DC), caractérisés par la présence minimum de 2 domaines protéiques consécutifs de sous classes particulières et retrouvés dans au moins 3 génomes de souches de *Plasmodium falciparum* [77], sont pour certains impliqués dans la séquestration parasitaire lors d'un accès palustre grave tels que DC4 (DBL α 1.4-CIDR α 1.6-ID-DBL β 3) [78], DC5 (DBL γ 12-DBL δ 5-CIDR β 3/4-DBL β 7/9) [79], DC8 (DBL α 2-CIDR α 1.1-DBL β 12-DBL γ 4/6) [76], [80]–[83] et DC13 (DBL α 1.7-CIDR α 1.4) [76], [80]–[82] (Figure 11). D'autres techniques de bioinformatique ont récemment été publiées et permettent une analyse encore plus fine des séquences protéiques de PfEMP1 par l'identification de peptides immunogéniques de 15 à 20 mer de long, dont certains ont été potentiellement impliqués dans les phénomènes de *rosetting* et de cytoadhérence aux cellules trophoblastiques [84].



A



B



C

Figure 11 : Représentation schématique des domaines protéiques composant les domaines cassettes (A) DC8 et DC13 [82], (B) DC4 [78] et (C) DC5 [79].

c. Les récepteurs de l'hôte impliqués

Plusieurs récepteurs de l'hôte ont été décrits comme impliqués dans les différents phénomènes de cytoadhérence des globules rouges parasités aux cellules endothéliales (séquestration parasitaire), aux globules rouges non parasités (*rosetting*) et aux plaquettes (*clumping*) suite à leur interaction avec la protéine PfEMP1 parasitaire (Figure 12).

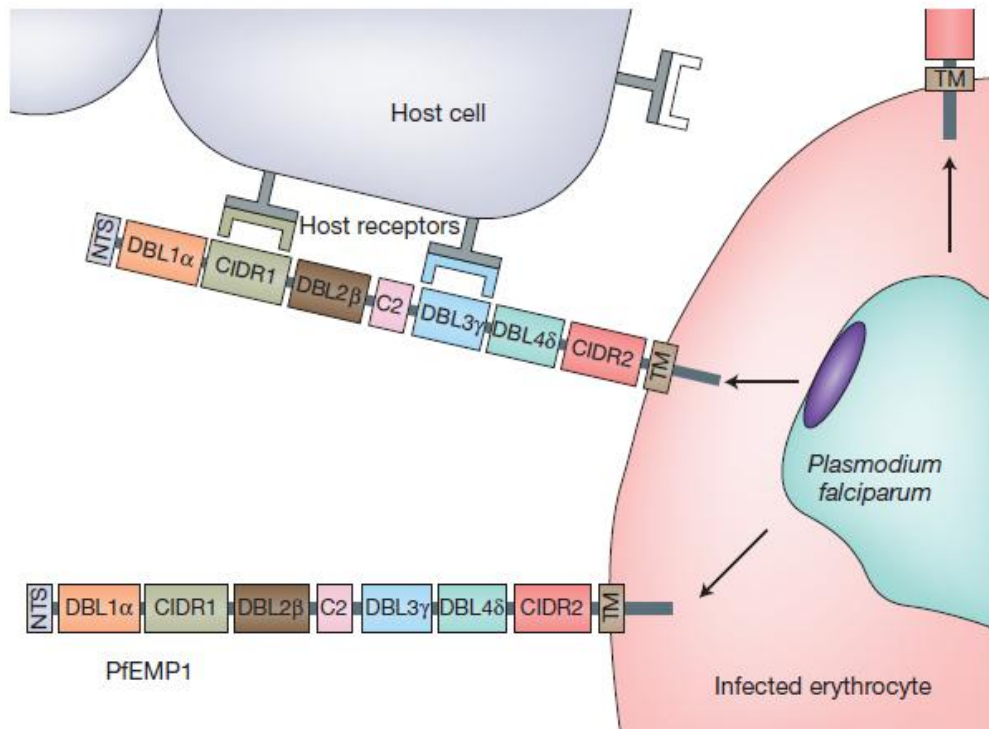


Figure 12 : Représentation schématique de l'interaction entre la protéine parasitaire transmembranaire PfEMP1 et les récepteurs cellulaires de l'hôte [68].

Le CD36 et la thrombospondine (TSP) furent les premiers récepteurs endothéliaux impliqués dans des interactions avec les globules rouges parasités [72], [85].

- CD36 est un récepteur de type scavenger de 88 kDa majoritairement exprimé à la surface des cellules endothéliales, des cellules épithéliales, des macrophages, des monocytes, des cellules dendritiques, des plaquettes, des précurseurs des érythrocytes et des adipocytes [68], [76]. L'interaction entre PfEMP1 et CD36 a notamment été

décrite dans les phénomènes de cytoadhérence avec l'endothélium vasculaire via le domaine CIDR α pour quasiment toutes les souches de *Plasmodium falciparum* quelque soit le contexte clinique [67], [76], [86], [87]. Néanmoins, la fréquence de fixation et la quantité séquestrée sur ce récepteur est plus importante dans les cas de paludisme simple notamment au niveau de sites tissulaires non pathogènes tels que les tissus adipeux et les tissus musculaires squelettiques. CD36 peut également être impliqué dans l'accès palustre grave avec une forte fixation de certains isolats cliniques à ce récepteur et un rôle potentiel de CD36 dans les phénomènes de *rosetting* et de *clumping* via son interaction avec le domaine protéique DBL α [67], [76], [86]–[88]. Cependant, la cytoadhérence à CD36 par PfEMP1 n'a pas uniquement été associée à la séquestration parasitaire mais semblerait également jouer un rôle dans la clairance parasitaire en favorisant la phagocytose non opsonique des globules rouges parasités au niveau des monocytes/macrophages/cellules dendritiques [87], [89] et serait également responsable d'une immunomodulation des fonctions des cellules dendritiques [76], [87].

- La TSP est une glycoprotéine plasmatique circulante qui a également été décrite dans les phénomènes d'adhérence avec PfEMP1. Néanmoins, contrairement à CD36, les effets de l'interaction entre ces 2 protéines sont peu documentés et le rôle de TSP dans la survenue d'un accès grave est de plus en plus controversé [68].

VCAM-1, ICAM-1 et E-selectine furent par la suite identifiés comme impliqués dans ce phénomène de cytoadhérence [67].

- ICAM-1 (CD54), récepteur de la superfamille des immunoglobulines de 90-115 kDa, est exprimé à la surface des cellules endothéliales et des leucocytes. C'est un récepteur d'intérêt car il a été décrit comme le principal récepteur impliqué dans la séquestration

parasitaire à l'origine de l'atteinte neurologique lors d'un accès palustre grave. Cependant, selon les études, certains isolats de patients sont plus ou moins adhérents à ce récepteur, préférentiellement exprimé dans les capillaires cérébraux [87], [88], [90]. Cette variabilité de cytoadhérence sur ce récepteur a tout d'abord été expliquée par la méthodologie utilisée pour les études de cytoadhérence : en effet, la proportion de globules rouges cytoadhérents est variable selon que la cytoadhérence est évaluée en mode statique ou en flux [86]. De plus, le polymorphisme de séquences d'ICAM-1 influence l'affinité à ce récepteur [87]. C'est plus spécifiquement les domaines protéiques DBL β 3 et DBL β 5 de PfEMP1 qui ont été identifiés comme les ligands préférentiels de PfEMP1 sur ICAM-1 [68], [76], [86]. Cependant, la seule interaction entre la surface du globule rouge parasité et ICAM-1 ne semble pas suffisante pour entraîner la cytoadhérence du globule rouge parasité et l'hypothèse de l'existence d'un corécepteur tel que CD36 a été émise [67], [68].

- VCAM-1 (CD106) est également un récepteur de la superfamille des immunoglobulines exprimé à la surface de l'endothélium activé. Ce récepteur interagit faiblement aux globules rouges parasités et son rôle dans l'accès palustre n'a été que très peu étudié.
- E-selectine (CD62E) est une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules endothéliales dont le rôle et le type d'interaction avec le globule rouge parasité sont peu connus.
- P-selectine (CD62P) est également une glycoprotéine de la surface des cellules endothéliales, impliquée dans le transfert des leucocytes et également exprimée à la surface des plaquettes. Même s'il semble que P-selectine interagisse avec PfEMP1,

son rôle dans la séquestration parasitaire et les effets qui en découlent sont inconnus [68]. De plus, P-selectine semble jouer un rôle accessoire dans le *clumping*.

- PECAM (CD31) est un récepteur situé à la surface des cellules endothéliales, des monocytes, des plaquettes et des granulocytes, impliqué dans la cytoadhérence avec PfEMP1. Son rôle dans la survenue d'un accès grave n'a pas été totalement prouvé mais un domaine protéique spécifique de ce récepteur, DBL δ , exprimé par certains variants de PfEMP1 et appartenant au domaine cassette DC5, a été décrit comme principal ligand de PECAM dans l'accès palustre grave [79].
- Depuis peu, un nouveau récepteur a été décrit et incriminé dans la survenue du paludisme grave : le récepteur à la protéine C (EPCR) [91], [92]. Ce récepteur, plus généralement présent à la surface des cellules endothéliales des larges vaisseaux sanguins qu'au niveau des microvaisseaux, est aussi présent à la surface des polynucléaires neutrophiles, des monocytes, des cellules musculaires lisses, des kératinocytes, des trophoblastes, des cardiomyocytes et des neurones [92]. Ce récepteur est impliqué dans des activités anti-inflammatoires et anti-thrombotiques permettant le maintien de l'homéostasie de la coagulation et l'intégrité dans la barrière vasculaire endothéliale [76], [92]. La cytoadhérence à EPCR est principalement impliquée dans l'accès palustre grave et plus précisément dans la présentation neurologique de la maladie suite à l'interaction entre ce récepteur et la partie CIDR α 1 des domaines cassette DC8 et DC13 de PfEMP1 [75], [76], [91].
- De manière plus anecdotique, d'autres récepteurs ont été décrits comme intervenant dans le phénomène de cytoadhérence aux cellules endothéliales. La fractalkine/CX3CL1 endothéliale exprimée au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral a été mise en évidence dans un cas de neuropaludisme mais aucune autre

donnée n'est disponible pour cette molécule tout comme pour l'intégrin $\alpha\beta3$ et la fibronectine [68], [70].

Le phénomène de *rosetting* est fortement associé à l'accès palustre grave [93] et fait intervenir, en dehors de CD36, d'autres types de récepteurs principalement situés à la surface du globule rouge parasité et non parasité. Des interactions ont été décrites avec les antigènes du groupe sanguin A et B, l'héparane sulfate (HS), le récepteur du complément (CR1) et les globules rouges parasités.

- L'HS est un glycosaminoglycane présent à la surface des cellules endothéliales et des globules rouges impliqué dans le phénomène de *rosetting* associé à la sévérité de l'infection palustre.
- CR1 est une protéine régulatrice du complément située à la surface du globule rouge, des leucocytes et des cellules dendritiques folliculaires. C'est le principal récepteur de l'hôte impliqué dans le *rosetting*.
- Les antigènes des groupes sanguins A et B sont des trisaccharides fixés sur des glycoprotéines et glycolipides insérés dans la membrane des globules rouges mais sont également retrouvés sur les plaquettes, les leucocytes et les cellules endothéliales. Les domaines protéiques DBL α de PfEMP1 seraient impliqués dans les interactions avec ces récepteurs lors du phénomène de *rosetting*, avec une affinité plus importante pour les antigènes du groupe A [89]. Le groupe O peut également être à l'origine de *rosetting* mais son rôle reste plus faible par rapport aux antigènes du groupe A et B.

Le principal domaine de PfEMP1, décrit pour interagir avec les récepteurs ci-dessus lors du phénomène de *rosetting*, est le domaine DBL $\alpha1$ situé sur la partie N-terminale de PfEMP1. Ce domaine protéique spécifiquement identifié et impliqué dans ces interactions lors d'un

accès palustre grave a la particularité d'avoir une délétion de 2 résidus cystéines sur sa partie C-terminale par rapport au domaine DBL α 1 exprimé lors d'un accès palustre simple qui est composé de 4 résidus cystéines [94]–[96]. De récentes études ont par la suite plus précisément identifiées un des domaines protéiques impliqué dans ce phénomène de *rosetting*, indépendamment du récepteur CD36, qui serait composé du tandem DBL α 1-CIDR $\beta/\gamma/\delta$ [75].

- L'interaction entre PfEMP1 et les immunoglobulines M (IgM) non dirigées contre un antigène spécifique de *P. falciparum* est fréquemment retrouvée chez les souches de *Plasmodium falciparum* ayant un phénotype de *rosetting*. Ce profil d'adhérence, non directement impliqué dans ce phénomène mais fortement corrélé, semble faciliter la formation de ces structures de « rosettes » en stabilisant les liaisons entre globules rouges parasités et globules rouges non parasités [67], [97]. Ce type d'interaction aux IgM non immunes facilite également l'évasion au système immunitaire de l'hôte infecté en limitant l'exposition de certains épitopes de PfEMP1 aux immunoglobulines G protectrices par fixation des IgM aux régions non impliquées dans la cytoadhérence et n'altérant pas par conséquent, le phénotype d'adhésion initial de la souche infectante [98].

L'agglutination des globules rouges parasités via les plaquettes ou *clumping* fait intervenir des récepteurs précédemment décrit tel que CD36 et P-selectin mais également certains récepteurs spécifiques.

- gC1qR/HABP/p32 est une protéine multifonctionnelle positionnée à la surface des plaquettes activées et des cellules endothéliales qui a été récemment décrite comme jouant un rôle dans le phénomène de *clumping* lors d'un accès grave à présentation neurologique [70].

Au total, les phénomènes de cytoadhérence font intervenir un grand nombre de récepteurs cellulaires avec lesquels PfEMP1 interagit de manière simple mais également multiple. Certaines souches de *Plasmodium falciparum* ont effectivement montré la capacité de pouvoir interagir avec plusieurs récepteurs simultanément [99] ou font intervenir à la fois un phénomène de *rosetting* et de cytoadhérence [100]. Ce phénotype de polyadhérence, pouvant constituer un facteur de virulence pour l'hôte [67], n'a pour l'instant été mis en évidence qu'*in vitro* sur des souches de laboratoire de *Plasmodium falciparum* et n'a pas été confirmé à l'heure actuelle sur des isolats cliniques.

d. Les gènes *var*

Les protéines parasitaires PfEMP1 de *Plasmodium falciparum* sont codées par une famille hautement polymorphique de gènes appelés les gènes *var*. Cette famille multigénique, exclusivement présente dans le génome de *Plasmodium falciparum* [101], est composée d'environ 60 gènes répartis sur l'ensemble des 14 chromosomes du génome parasite préférentiellement localisés au niveau des régions télomériques et subtélomériques (60% des gènes) mais également dans certaines régions centromériques (chromosome 4, 6, 7, 8 et 12) (40% des gènes) [102]. De tailles variables (3.9 à 13kb), ces gènes sont tous composés de 2 régions exoniques (1 et 2) séparés par une région intronique de 1kb [67].

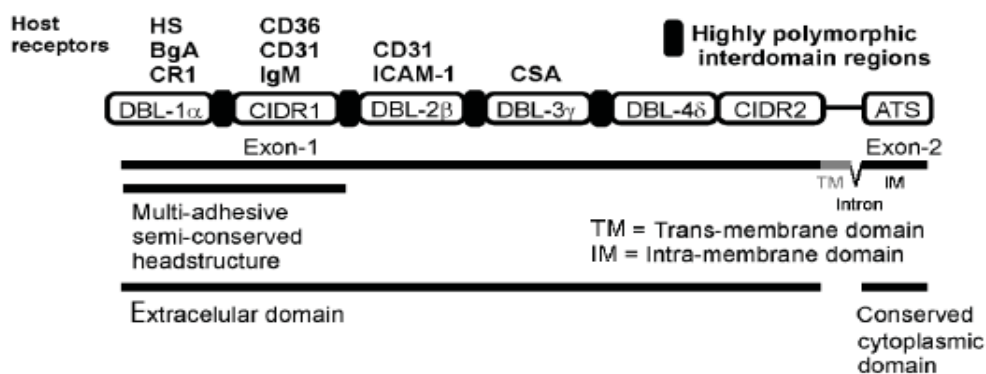


Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation d'un gène *var* codant pour une protéine PfEMP1 [103].

L'exon 1 d'un gène *var* code pour la partie extracellulaire N terminale de PfEMP1 tandis que l'exon 2 code pour la région conservée en C-terminale (figure 13). L'expression de cette famille de gènes est finement régulée au cours du cycle intra-érythrocytaire du parasite : au stade du jeune trophozoïte, de nombreux gènes *var* sont transcrits en même temps sur tout le génome parasitaire mais, à travers un mécanisme de régulation basé sur le principe d'exclusion allélique mutuelle lors du développement intra-érythrocytaire, seul un gène *var* et par conséquent un seul variant de PfEMP1 est majoritairement exprimé, au stade trophozoïte âgé, à la surface du globule rouge parasité, à un temps donné [67], [104]. Ce principe, encore largement admis dans la littérature, a commencé à être controversé suite à la découverte *in vitro* qu'une souche de *Plasmodium falciparum* peut présenter un phénotype d'adhérence à 2 récepteurs cellulaires différents suite à l'expression simultanée de 2 gènes *var* différents [99]. Cependant, l'expression multiple simultanée de plusieurs gènes *var* responsable de l'expression de PfEMP1 différents à la surface du globule rouge parasité n'a pas été mise en évidence chez des isolats patients laissant penser que ces observations sont influencées par la manipulation *in vitro* des souches.

Contrairement aux gènes *var* plus conservés dans les régions centromériques, la localisation de certains gènes *var* dans les régions subtélomériques rend leur structure plus vulnérable aux mutations ponctuelles, aux échanges génétiques entre chromosomes ainsi qu'aux recombinaisons géniques entre chromosomes non-homologues dans le génome parasite [67], [101], [102], [105]. Cette hypervariabilité mosaïque des séquences génomiques, caractérisée *in silico* par le partage de séquence ou partie de séquence « Position Specific Polymorphic Block » (PSPB) au niveau par exemple de la séquence DBL α [105], se traduit par un taux de modification du répertoire des gènes *var* exprimés de 2% par génération [67], [69]. La forte variabilité de la séquence protéique de PfEMP1 qui en découle est responsable d'une variation antigénique de surface à l'origine de l'échappement à la réponse immunitaire de *Plasmodium falciparum* [106] et par conséquent de variation du phénotype d'adhérence du globule rouge parasité. Ce switch du répertoire exprimé des gènes *var* qui avait été confirmé *in vitro* [104] a été également décrit *in vivo* chez des volontaires sains infectés en phase aigue où le taux de variation de l'expression des gènes *var* est de 16% en tout début d'infection avant de diminuer à environ 2% en cours d'infection ou après transmission à un autre hôte [107].

De par leur positionnement chromosomique (centromérique ou télomérique), leur sens de transcription, leur nombre de copies dans le génome, l'homologie des séquences dans les régions codantes et non codantes et la nature de leur région promotrice (UpsA, UpsB, UpsC, UpsD et UpsE), les gènes *var* ont été classés en différents sous-groupes tels que A, B, C, B/A, B/C [108], Var1, Var2, Var3 [109] et Var4 [110]. Les groupes B/A et B/C représentent des groupes intermédiaires avec la présence de la région UpsB associée à la séquence d'un autre groupe. L'expression de ces différents gènes *var* a été associée, au cours de plusieurs études chez différentes populations vivant en zone d'endémie, à certains profils cliniques et à différents phénotype de cytoadhérence. La transcription de ces groupes de gènes a ainsi été

étudiée lors de suivi de patients infectés en Papouasie-Nouvelle-Guinée confirmant une expression multiple et variable des groupes de gènes *var* B et C au cours de l'infection palustre simple ou asymptomatique [111]. Un autre travail mené également chez des populations de Papouasie-Nouvelle-Guinée a confirmé la surexpression du groupe de gènes C dans des formes cliniques asymptomatiques [112], [113]. En parallèle, des investigations *in vitro*, par sélection de souches de *P. falciparum* avec des sérums hyper immuns de patients ou après passage sur des tissus endothéliaux humains, avaient révélé qu'un groupe restreint de PfEMP1 de structure antigénique conservée, issu de l'expression du groupe de gènes *var* A, était préférentiellement exprimé à la surface des globules rouges lors des accès palustres graves [114]. L'étude de transcrits dans différents tissus humains lors d'examen *post mortem* a par la suite mis en évidence que différents groupes de gènes *var* étaient exprimés en fonction de la nature de l'organe et que le cerveau contenait une population particulière et conservée de parasites exprimant un même sous groupe de gènes *var* A [115]. L'implication des groupes de gènes *var* A et B/A, codant pour un type de protéines PfEMP1 incriminé dans la survenue d'un accès palustre grave [114], tels que DC4 [78], DC5 [79], DC8 et DC13 [80]–[83] a été confirmée dans d'autres études cliniques menées en zone d'endémie par la mise en évidence d'une surexpression de certains gènes *var* du groupe A, B/A et des domaines cassettes 4, 5, 8 et 13 dans les accès palustres graves [80]–[83], [88], [112]–[114], [116] mais les résultats d'autres études sont contradictoires avec une surexpression possible des gènes du groupe B lors des formes de neuropaludisme chez des populations d'enfants en zone d'endémie [88], [112], [116]–[118]. L'expression préférentielle de ces groupes de gènes *var* A et B lors d'un accès palustre grave serait liée aux modifications épigénétiques des régions subtélomériques du génome de *Plasmodium falciparum*, engendrées par des facteurs de stress de l'hôte qui stimulent l'expression de gènes de la famille des sirtuins, tel que PfSir2a, codant pour des enzymes histone-déacetylase [119]. Des études de profils transcriptionnels sur

génomique entier de souches de *Plasmodium falciparum* lors d'un accès grave avaient aussi montré, au sein d'un même groupe clinique, des différences biologiques entre les souches en termes d'adhésion, de réplication d'ADN, de multiplication parasitaire et de métabolisme [120].

D'autres techniques d'investigations du répertoire des gènes *var* dans une population donnée ont été décrites pour essayer d'associer un profil d'expression à une situation clinique précise. L'étude de l'expression et le séquençage de la région la plus conservée NTS-DBL1 α de PfEMP1 a permis d'impliquer le domaine protéique DBL1 α , issu de l'expression des groupes de gènes *var* A et B/A, dans la pathogénèse de l'accès palustre grave contrairement aux domaines non DBL1 α , produits de l'expression des groupes B et C, qui interviendraient dans les formes hyperparasitémiqes de l'accès palustre [96], [117]. Une classification de cette région DBL1 α en 6 groupes, basée sur la composition de sa structure protéique en cystéine et PoLV, a permis de corréler l'expression de transcrits contenant les séquences des groupes 1 à 3 de DBL1 α à celle des gènes *var* du groupe A lors d'un accès palustre grave tandis que les transcrits possédant les séquences des groupes 4 à 6 sont associés à l'expression des gènes B et C lors des formes asymptomatiques [113], [121]. La meilleure connaissance du génome de *Plasmodium falciparum* et le développement des techniques de bioinformatique ont permis d'identifier, par des techniques d'alignements successives de séquences *var*, des Homology blocks (HB) correspondant à des portions de séquences conservées dans le génome parasitaire. L'expression de ces HB a été corrélée, de manière plus fine, à un contexte clinique particulier ainsi qu'à un phénotype d'adhérence donné. Lors d'une étude, HB 54 et 171 ont ainsi été associés à un tableau d'accès palustre simple et HB 219 à un accès palustre grave avec *rosetting* contrairement à HB 204 qui serait associé à un accès grave sans phénotype de *rosetting* [122].

Le paludisme gestationnel est un bel exemple de la forte corrélation qui peut exister entre l'expression préférentielle de certains gènes *var* dans une situation clinique donnée. Alors que les gènes *var* des groupes A, B et C sont également exprimés dans le paludisme gestationnel, leurs implications restent néanmoins mineures par une expression préférentielle dans le sang périphérique par rapport à la microcirculation placentaire [123]. C'est le seul gène *Var2*, qui est très fortement associé au paludisme gestationnel et code pour un variant *PfEMP1* possédant un phénotype d'adhérence pour le récepteur chondroïtine sulfate (CSA) présent à la surface des syncytiotrophoblastes placentaires responsable de la séquestration des globules rouges parasités dans le placenta [123], [124]. La protéine *PfEMP1 Var2csa* codée par *Var2* est peu variable et constitue aujourd'hui un candidat vaccin sérieux pour la prise en charge du paludisme gestationnel.

Les autres gènes monocopie peu variable *Var1*, *Var3* et *Var4* semblent être exprimés de manière constitutive par *Plasmodium falciparum* et à l'heure actuelle aucune présentation clinique n'a été associée à leur expression [109], [110].

2. Les mécanismes immunopathologiques

Les mécanismes de cytoadhérence ne peuvent expliquer à eux seuls les lésions vasculaires observées lors d'un accès palustre grave. La présence de leucocytes, de plaquettes et d'autres cellules inflammatoires au sein des amas de globules rouges séquestrés dans la microcirculation capillaire, semble indiquer un rôle délétère de la réaction inflammatoire développée vis-à-vis de l'infection par *Plasmodium falciparum* via un déséquilibre de la balance de sécrétion de cytokines pro et anti-inflammatoires [70], [125]. L'indépendance de la séquestration parasitaire vis-à-vis de ces mécanismes immunopathologiques lors d'un accès palustre grave n'est cependant pas totalement prouvée et il semblerait que ces 2 mécanismes soient finalement intimement liés.

Une des principales causes identifiées dans la littérature à l'origine de ces mécanismes immunopathologiques serait la production de toxines malariques qui aurait pour conséquence une hyperproduction de cytokines pro-inflammatoires chez l'hôte infecté. Néanmoins, la reconnaissance de motifs antigéniques parasitaires tel que le motif protéique DBL α de PfEMP1 par les lymphocytes CD4 [126]–[128] ou d'autres motifs antigéniques par les récepteurs cellulaires Toll-Like Receptors (TLR) ou CD36 des macrophages, des plaquettes, des cellules dendritiques et cellules Natural killer (NK) peut être à l'origine d'une réponse pro-inflammatoire exacerbée [129]–[132].

Les toxines malariques sont des produits synthétisés et sécrétés par le parasite lors des stades matures de son développement intra-érythrocytaire et notamment lors de la rupture du globule rouge parasité par le schizonte. Les principales toxines malariques identifiées dans la physiopathologie de l'accès palustre grave sont la famille des protéines transmembranaires ancrées à des résidus glycosylphosphatidylinositol (GPI) [133] et les complexes d'hémozoïnes (Hz) produits par le parasite lors de la détoxification de l'hème [67]. L'interaction des protéines GPI avec diverses cellules de l'immunité innée et adaptative, et la phagocytose par les monocytes/macrophages de l'hémozoïne libérée module la synthèse des médiateurs de l'inflammation. Même si les cytokines pro-inflammatoires, *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), interféron gamma (IFN- γ), interleukine-6 (IL-6), interleukine-2 (IL-2) et interleukine-1 (IL-1) jouent un rôle précoce majeur dans le contrôle de la multiplication parasitaire, une hyperproduction de ces cytokines stimulée entre autre par la sécrétion des toxines malariques, sans régulation par les lymphocytes T régulateurs (Treg) ni par la cytokine anti-inflammatoire interleukine-10 (IL-10) [129], a un effet délétère pour l'hôte infecté [67], [129], [134].

Les principales conséquences sont une majoration de la symptomatologie clinique, une dysrégularisation de certains mécanismes cellulaires mais également une déstabilisation de la

réaction immunitaire nécessaire au contrôle du parasite par une régulation positive ou négative de chemokines et cytokines pro- et anti-inflammatoires [134]. L'augmentation de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α amplifie la symptomatologie de l'accès palustre tels que les courbatures, les frissons, les nausées, les vomissements, les diarrhées et la fièvre via l'activation de la cyclooxygénase de type 2 favorisant la production des prostaglandines [134]. L'hyperproduction d'IL-6 stimule le recrutement des leucocytes au niveau du site d'infection ce qui peut avoir comme effet d'entraîner une boucle d'amplification de la réaction inflammatoire. Les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ activent les cellules endothéliales vasculaires entraînant une augmentation de la densité de récepteurs impliqués dans la cytoadhérence à la surface des cellules ainsi que la perméabilité de la paroi vasculaire [67], [134]. La corrélation entre une hyperproduction cytokinique et un accès palustre grave a été mise en évidence chez des cohortes de patients, enfants et adultes, résidant ou non en zone d'endémie. Une augmentation des concentrations plasmatiques d'interleukine 12 (IL-12), IL-1, d'IL-6, d'IL-10, d'IL-2, de TNF- α , d'IFN- γ , d'interleukine 8 (IL-8), d'interleukine 4 (IL-4) et une diminution de production de *tumor growth factor* β 1 (TGF- β 1) sont des facteurs favorisant la survenue d'un accès palustre grave chez les personnes non exposées « naïves » tels que les enfants en zone d'endémie et les voyageurs par rapport à des populations adultes vivant en zone d'endémie [135]–[137]. Cette réponse de type Th1 favorisant la réponse immunitaire à médiation cellulaire semble indépendante de l'âge du patient infecté et serait plutôt liée aux premiers contacts avec *Plasmodium falciparum* [135]. Cette réponse immunitaire extrême délétère pour l'organisme de l'hôte est proche de celle décrite dans le syndrome de reconstitution immunitaire (IRIS) [138].

3. Conséquences de l'infection par *Plasmodium falciparum*

a. Au niveau cellulaire

La séquestration parasitaire dans la microcirculation des veinules post-capillaires entraîne une activation des cellules endothéliales vasculaires à l'origine de nombreuses répercussions physiologiques (figure 14).

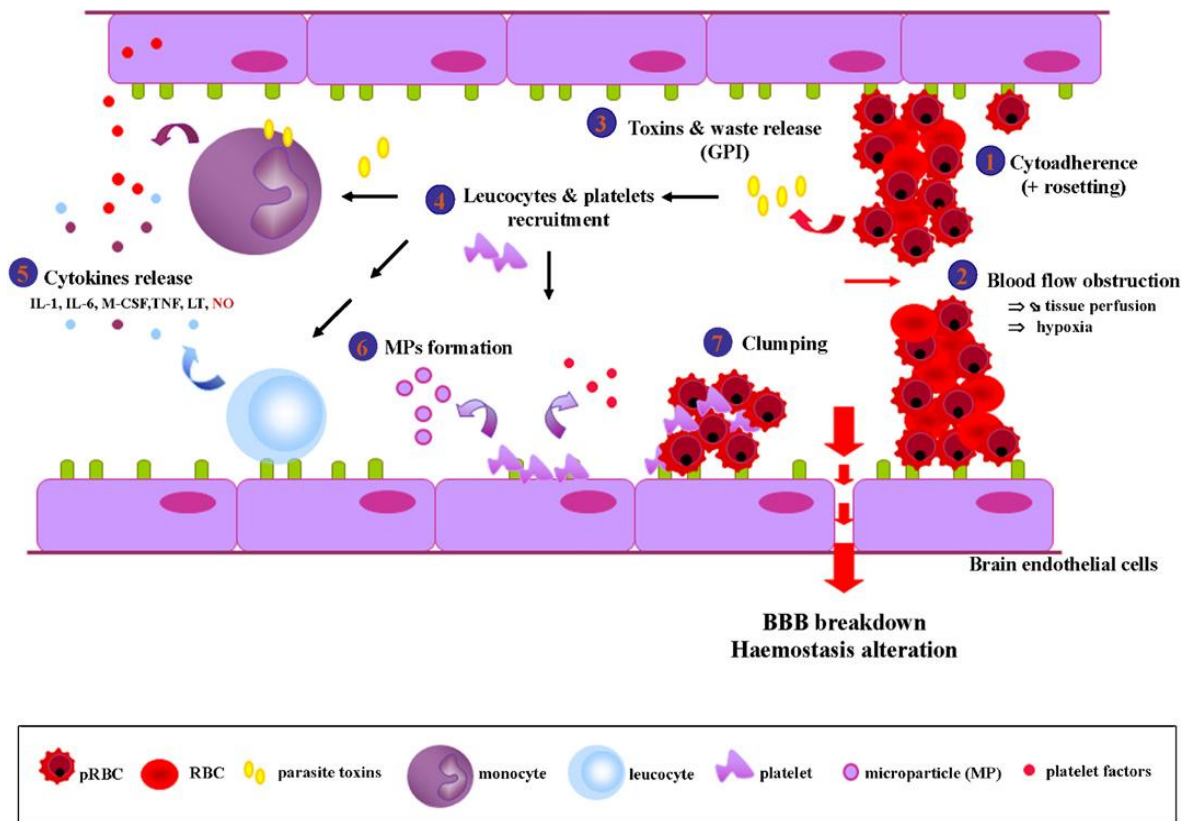


Figure 14 : Principaux mécanismes physiopathologiques au niveau des cellules endothéliales à l'origine de la rupture de la barrière endothéliale [125].

L'activation de l'endothélium vasculaire par contact direct avec le globule rouge favorise tout d'abord un état pro-adhésif endothélial par une augmentation de la densité de récepteurs impliqués dans le phénomène de cytoadhérence à la surface des cellules [139]. L'adhésion à l'endothélium est également à l'origine de troubles de la coagulation par l'induction de

l'expression du facteur tissulaire via l'activation des cellules endothéliales, qui entraîne l'activation de la cascade de la coagulation avec une consommation des plaquettes. La thrombopénie qui en résulte peut être associée à une augmentation du risque hémorragique au niveau des tissus touchés.

Cette altération de la cascade de la coagulation est également liée à un défaut de la voie métabolique de la protéine C favorisant un état pro-coagulant fréquemment rencontré dans le neuropaludisme. Ce déficit métabolique est en partie associé à l'occupation des sites de liaison de la protéine par la protéine PfEMP1 du globule rouge parasité mais également à une perte des récepteurs EPCR à la surface des cellules endothéliales dont la répercussion est plus importante dans les tissus cérébraux, liée à leur faible nombre de départ contrairement aux tissus endothéliaux périphériques [92], [140]. La perte des EPCR membranaires cérébraux est associée à un relargage de ces récepteurs sous forme soluble dont la quantité est corrélée à la gravité de l'infection chez les enfants de moins de 5 ans en zone d'endémie [141]. L'activation des cellules endothéliales est également accompagnée de l'exocytose de corps de Weibel-Palade libérant du facteur Von Willebrand de grande taille, son propeptide et de l'angiopoïétine-2 contenus dans ces structures [125]. Le facteur Von Willebrand de grande taille a la capacité de se fixer à l'endothélium activé mais également de fixer des plaquettes qui serviront de ponts via les récepteurs CD36 pour les globules rouges parasités [142]. La formation de ce complexe globule rouge-plaquette-Von Willebrand consomme les plaquettes, ce qui favorise encore la thrombopénie. L'élimination de cette structure de l'endothélium entraîne la consommation d'ADAMTS13, protéase spécifique du clivage du facteur Von Willebrand, potentiellement à l'origine d'un processus de micro-angiopathies thrombotiques [142]. Sous l'effet du VEGF, l'angiopoïétine-2 possède un effet sur la régulation de la réponse inflammatoire, sur l'activation de l'endothélium mais surtout sur son intégrité. Ainsi,

l'angiopoïétine-2 est considéré comme un marqueur de gravité car responsable de la rupture de la barrière endothéliale.

En parallèle, l'activation de cellules de l'immunité innée via la séquestration parasitaire et la production de toxines parasitaires décrite précédemment sont à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires favorisant le recrutement et l'activation d'autres cellules inflammatoires et de l'immunité telles que les leucocytes, les plaquettes et les lymphocytes cytotoxiques. Le passage dans la circulation générale de ces cytokines pro-inflammatoires peut avoir des répercussions sur l'érythropoïèse dont les conséquences directes sont l'anémie chez le sujet infecté [134]. L'activation des monocytes par le parasite stimule la production importante de radicaux libres et de monoxyde d'azote (NO) dont les effets protecteurs de départ sur l'endothélium vasculaire peuvent avoir un effet délétère, l'hyperproduction de la synthèse de NO via l'induction de la NO synthase (iNOS) par les cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- α peut rompre la barrière endothéliale [125], [129], [143].

Enfin, l'activation de l'endothélium vasculaire, des plaquettes, des leucocytes et le développement intra-érythrocytaire du parasite sont à l'origine de la production et de la libération de microparticules (MP), fragments vésiculaires de la membrane plasmique des cellules d'origine où figurent les antigènes de surface. Ces MP produites lors de l'accès palustre, dont la quantité est directement corrélée à la gravité du tableau clinique [144]–[147], sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiopathologiques: elles favorisent la diminution de l'activité d'ADAMS 13 à l'origine de micro angiopathies thrombotiques [148], modulent la réponse immunitaire pro-inflammatoire des macrophages et des polynucléaires neutrophiles en augmentant la production en TNF- α [149], [150] et favorisent la cytoadhérence des globules rouges parasités en transférant certains antigènes de l'hôte à leur surface [151].

b. Au niveau clinico-biologique

La séquestration parasitaire au niveau des cellules endothéliales ainsi que les phénomènes de *rosetting* et de *clumping* obstruent la microcirculation des veinules post capillaires réduisant le flux sanguin au niveau des organes. Cette hypoperfusion d'organes peut avoir des retentissements organiques importants notamment une nécrose des tissus en aval de la zone atteinte qui peut être localisée au niveau des tissus cérébraux ce qui caractérise le neuropaludisme mais également au niveau rénale qui se manifeste par une insuffisance rénale aiguë oligurique dans 60-70% des cas mimant pathologiquement une nécrose tubulaire aiguë, ou au niveau du foie avec une cytolysé hépatique et une cholestase [11]. L'obstruction de la microcirculation des tissus profonds est visible lors d'examens anatomopathologiques post-mortem [11], [152]. L'activation du métabolisme anaérobique de consommation du glucose au niveau cellulaire liée à la diminution de l'apport d'oxygène aux tissus favorise deux processus très différents : du point de vue parasitaire, cet environnement anaérobique dans les capillaires est favorable à la croissance parasitaire ce qui explique en partie, avec l'échappement à la clairance splénique, les fortes parasitémies rencontrées dans les accès palustres graves [66], de plus, la glycolyse anaérobique favorise la production d'acide lactique et de corps cétoniques dans la circulation générale qui se traduit par une hyperlactatémie voire une acidose métabolique, critères biologiques fréquemment rencontrés dans l'accès palustre grave et fortement associés à la mortalité [11], [125], [138], [143]. L'acidose métabolique peut également être engendrée par un ensemble d'autres facteurs tel qu'un état de choc causé par l'hypovolémie liée à la séquestration parasitaire, l'anémie sévère, l'altération des propriétés rhéologiques des globules rouges non parasités, les convulsions récentes ou la diminution de l'élimination des déchets métaboliques par le foie [11], [138]. L'acidose métabolique générée par ces différents phénomènes peut être compensée par une hyperventilation correctrice qui, dans certains cas, peut se compliquer secondairement d'une

dépresseion respiratoire aigue [143]. L'hyperventilation peut également être majorée en cas d'anémie sévère lors d'un accès palustre grave [143].

Pour se défendre et parer à la séquestration parasitaire à l'origine de la survenue d'un accès grave, l'hôte a développé un ensemble de mécanismes immunologiques.

III. L'immunité anti-palustre

1. Dogme de l'acquisition de l'immunité naturelle

a. Historique

L'hypothèse de l'existence d'une immunité anti-palustre protectrice avait déjà été évoquée par les colons européens en zone intertropicale en observant la résistance des populations locales à l'infection palustre et cela avant même la découverte de l'agent infectieux du paludisme au 19^{ème} siècle [153]. En Indonésie, Robert Koch avait également remarqué une résistance clinique des habitants locaux face à l'infection palustre qui maitrisaient davantage la multiplication parasitaire avec l'observation d'une plus faible parasitémie, ce qui lui avait fait envisager l'existence de mécanismes immunologiques à l'origine de cette protection [153]. En 1920, les bases de cette immunité protectrice furent posées décrivant une immunité bâtie sur une exposition ininterrompue au parasite, de durée de vie courte, spécifique d'espèces et du stade parasitaire et dépendant du degrés d'exposition [153]. L'utilisation de la malariathérapie dans le traitement de la syphilis tertiaire a permis de démontrer par la suite qu'une immunisation palustre induite par les injections répétées de souches de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* et *Plasmodium malariae* est possible [153]. Néanmoins, cette immunité anti-palustre est d'acquisition complexe et semble être régie par trois principaux facteurs.

b. Influence de l'âge et du temps d'exposition au parasite

L'âge est un des facteurs prépondérants pour l'acquisition de l'immunité anti-palustre en zone d'endémie mais qu'il est parfois difficile de dissocier du temps d'exposition au parasite [154].

Les enfants de moins de 5 ans sont considérés comme à risque de développer un accès palustre grave du fait de l'absence d'une immunité palustre à cet âge. Exposé durant toute l'enfance en zone de forte endémicité, l'enfant va au départ rapidement mais progressivement développer une immunité « anti-maladie », entre environ 3 mois et 5 ans, qui lui permettra de mieux maîtriser la symptomatologie liée à l'infection palustre et ainsi limiter l'apparition des formes graves de la maladie. Par la suite, il développera dans un second temps une immunité « anti-parasitaire » qui lui permettra de contrôler le développement parasitaire et ainsi de limiter la densité parasitaire. Enfin, une immunité dite de « prémunition » vis-à-vis de l'accès palustre se développera à l'adolescence et chez l'adulte associée au maintien d'une infection asymptomatique sans fièvre avec de très faibles densités parasitaires [153]. Cette immunité demeure cependant non stérilisante et n'empêche pas une réinfection du sujet. De plus, cette immunité est considérée comme de courte durée en l'absence d'exposition continue au parasite resoumettant les patients aux formes graves de l'infection quelques mois à quelques années après l'arrêt de l'exposition.

Indépendamment du temps d'exposition au parasite, l'âge de l'hôte reste un facteur important pour le développement d'une immunité protectrice contre un large répertoire antigénique [154]–[162]. Alors que le jeune enfant en zone d'endémie a besoin d'une exposition longue pour développer une immunité palustre, il semblerait que les enfants dont l'exposition au parasite est retardé de plusieurs mois par l'administration d'un traitement chimioprophylactique ou les adultes n'ayant jamais été exposés au parasite, développent beaucoup plus rapidement une immunité protectrice vis-à-vis notamment des infections graves, lorsqu'ils sont soumis à une forte exposition sur une courte durée. Cette protection est plus ou moins associée à de forts taux d'anticorps et apparaît quelque soit l'âge de l'hôte [154]–[158], [162] faisant suite aux premières infections qui apparaissent cependant plus graves que celles constatées chez l'enfant exposé en continu [157], [158], [163]. Une des

hypothèses de cette différence de vitesse de développement de l'immunité anti-palustre repose sur la maturité du système immunitaire de l'hôte [156]. Contrairement aux patients adultes, les enfants sont considérés comme immatures immunologiquement vis-à-vis du parasite [156], [164]. Cette maturité immunologique semble coïncider avec l'apparition de la puberté et la production de certaines hormones telle que le sulfate de dehydroepiandrosterone confirmant que le passage à l'âge adulte est un événement indispensable pour l'acquisition rapide d'une immunité anti-palustre efficace [164].

c. Influence des infections à répétition

L'acquisition d'une immunité anti-palustre en zone d'endémie est longue et met plusieurs années à se développer avant de devenir protectrice contre les formes graves à l'âge adulte. Par conséquent, les enfants en zone d'endémie doivent être exposés durant toute leur enfance afin d'acquérir une immunité protectrice. L'existence d'une variabilité importante de certains antigènes de *Plasmodium falciparum* et le développement d'une immunité spécifique de la souche infectante sont à l'origine de cette acquisition longue et tardive [165], [166]. Les infections répétées dès le plus jeune âge permettent à l'hôte de se constituer un répertoire immunologique spécifiquement dirigé contre les antigènes de la souche infectante mais également contre d'autres variants d'antigènes plasmodiaux de souches circulantes de la zone endémique via une immunité croisée entre les souches présentant des épitopes communs pour un phénotype de cytoadhésion donné. Ceci explique l'acquisition « rapide » d'une immunité vis-à-vis d'un très grand nombre d'antigènes de surface [153], [160], [167].

Cependant, la survenue d'un accès palustre grave ne semble être due qu'à l'expression non aléatoire d'un groupe restreint de gènes *var* du groupe A et B/A codant pour un groupe d'antigènes de surface conférant un avantage sélectif au parasite en terme de croissance et de cytoadhérence. Cette hypothèse fut confirmée notamment par Nielsen et *al.*, qui mit en évidence une reconnaissance rapide, par les anticorps de patients semi-immuns, des antigènes

de surface exprimés par les parasites chez les enfants présentant une forme grave de la maladie palustre [168]. D'autres études *in vitro* sur la réponse immunitaire protectrice vont dans ce sens à travers l'étude de la réaction immunitaire dirigée contre des antigènes de surface recombinants, produits de l'expression de gènes *var* du groupe A et B/A [169] tel que le gène PF11_0008 [170]. Par conséquent, la construction d'une immunité protectrice contre certaines formes graves de l'infection palustre semble être plus rapide et apparaîtrait après 1 à 2 infections [171]. Des lacunes dans le répertoire immunologique de l'hôte vis-à-vis de l'expression de nouveaux variants antigéniques de *Plasmodium falciparum* ne permettent pas un contrôle suffisant de la souche parasitaire ce qui est à l'origine de la réapparition de symptômes de l'accès palustre [168], [172].

d. Influence de l'endémicité

L'endémicité de la zone impaludée est le troisième facteur indispensable à l'acquisition naturelle d'une immunité efficace contre *Plasmodium falciparum* et reste complémentaire à l'âge et aux infections répétées. L'importance d'une forte transmission palustre a été révélée en comparant la rapidité d'acquisition d'une immunité protectrice en fonction de la zone d'endémie. Alors que l'acquisition d'une immunité protectrice indispensable pour le contrôle de la multiplication parasitaire limitant la survenue des formes graves de l'infection apparaît plus rapidement dans les zones de forte transmission en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud-Est chez les enfants et chez l'adulte [161], [169], [173]–[175], l'accès palustre grave touche encore des sujets adultes en Asie du Sud-Est où la transmission palustre est saisonnière et moins intense [153]. Ainsi, le développement d'une immunité anti-palustre est facilité pour une forte transmission palustre qui favorise les infections répétées de l'hôte, autre facteur prépondérant [174].

e. Cas particulier du paludisme d'importation

Les voyageurs non préalablement exposés à *P. falciparum* de même que les migrants de deuxième génération et les expatriés originaires de zones non endémiques, sont considérés à risque de présenter un accès palustre grave n'ayant pas développé d'immunité protectrice [153]. On considère que les migrants de première génération ayant été infectés de façon répétée avant leur migration, ont probablement développé une immunité protectrice. Cependant, la durée de la persistance de celle-ci sans réexposition au parasite est inconnue. A partir des études menées en France et en Europe chez des populations de migrants originaires de zones d'endémie, l'hypothèse d'une potentielle immunité anti-palustre qui persisterait même plusieurs années sans exposition a été émise [176]. Cette immunité à long terme avait été suggérée au départ chez des adultes résidents dans d'anciennes zones d'endémies palustres où le parasite a été réintroduit et qui ont conservé une immunité protectrice pendant plusieurs années [177]. Cette protection vis-à-vis des accès palustres graves observée dans le paludisme d'importation, serait assurée soit par des titres d'anticorps totaux [176] ou des taux d'IgG élevés dirigés contre divers antigènes exprimés par des mérozoïtes de *Plasmodium falciparum* [178], soit par une réponse cytokinique de type Th1 efficace [135]. La persistance de cette immunité protectrice semblerait être due aux cellules B mémoire (MBC) [179], [180], mises en évidence chez des voyageurs et migrants après plusieurs mois ou années sans réexposition à *Plasmodium falciparum* [181]. Cette hypothèse a également relancé l'intérêt et la nécessité de découvrir un vaccin pour prémunir du paludisme grave. Cependant, certaines données de la littérature sont contradictoires et ne semblent pas être en faveur d'une immunité à long terme chez ces populations du fait de l'observation de cas d'accès palustres graves chez les migrants africains [15].

2. La réponse immunitaire dirigée contre PfEMP1

a. Le rôle des anticorps

Les interactions entre le système immunitaire de l'hôte et *Plasmodium falciparum* sont des processus complexes qui ne sont, pour la plupart, pas tous encore compris. Il semblerait néanmoins que la réponse immunitaire naturellement acquise vis-à-vis du parasite soit majoritairement dirigée contre les stades parasitaires de la phase intra-érythrocytaire, principaux responsables de la symptomatologie de la maladie. Des études préalables sur l'immunité anti-palustre avaient mis en évidence le rôle protecteur du transfert passif d'immunoglobulines à partir de sérums de sujets immuns vivant en zone d'endémie à des sujets non immuns qui s'accompagnait d'un contrôle de la parasitémie et des signes cliniques identifiant ainsi les anticorps comme un des principaux agents protecteurs de l'immunité acquise [182]. De très nombreux antigènes ont été identifiés comme cibles de la réponse immunitaire humorale, exprimés à différents stades parasitaires : la *circumsporozoïte protein* des sporozoïtes (CSP), la *merozoïte surface protein* (MSP) [183], l'*associated merozoïte antigen-1* (AMA-1), l'*erythrocyte binding antigen-1* (EBA-1), le *Plasmodium falciparum* reticulocyte-binding protein homologue 5 (PfRH5) [184] ainsi que les *variant surface antigen* (VSA) dont PfEMP1.

Leur insertion dans la membrane, leur exposition prolongée à la surface des globules rouges parasités, zone d'interface hôte-parasite, leur grande variabilité antigénique ainsi que leur rôle majeur dans les phénomènes de cytoadhérence et de séquestration parasitaire ont tout naturellement désigné les VSA et notamment PfEMP1, la protéine majoritaire de ce groupe antigénique, principales cibles de la réponse immunitaire protectrice. Cette hypothèse fut par la suite confirmée par la présence d'anticorps protecteurs variant-spécifique anti-PfEMP1 mis en évidence dans une population d'enfants en Afrique [165]. Ces résultats ont été confirmés par des études *in vitro* qui révélèrent que PfEMP1, contrairement aux autres protéines VSA telles que RIFINS, SURFINS et STEVOR, reste la principale cible antigénique de la réponse immunitaire protectrice. La fixation des anticorps à PfEMP1 situé à la surface du globule

rouge parasité est suivie d'une diminution de la symptomatologie clinique [185]. Cependant, la très grande variabilité des séquences protéiques de PfEMP1 caractérisée par une multitude de domaines successifs et associée à différents phénotypes d'adhésion limite l'identification d'épitopes potentiels, cibles des anticorps circulants anti-palustres protecteurs.

b. Les effets de la réponse immunitaire humorale lors de l'infection palustre

- Nous avons précédemment vu que *Plasmodium falciparum*, par la variabilité des gènes *var* codant pour les protéines de surface PfEMP1, pouvait échapper au système immunitaire. Néanmoins, après avoir constitué un répertoire important d'anticorps vis-à-vis de nombreux variants antigéniques, l'hôte peut limiter la diversité antigénique des PfEMP1 en exerçant une pression de sélection sur les antigènes de surface ce qui empêche le parasite d'échapper à la réponse immunitaire et limite la variation de phénotype de cytoadhérence de *Plasmodium falciparum*. Cette limitation de la variabilité des protéines PfEMP1 a notamment été décrite lors d'infections asymptomatiques en zone d'endémie [186].
- La constitution d'un large répertoire d'anticorps suite à l'exposition prolongée à une population hétérogène d'isolats de *Plasmodium falciparum* permet également de limiter voire d'inhiber le phénomène de cytoadhérence via l'interaction entre les anticorps et les protéines PfEMP1 à la surface des globules rouges parasités [187], [188]. Dans un contexte de transmission hyperendémique, la présence d'anticorps capables d'interagir avec certains domaines protéiques de PfEMP1 impliqués dans la survenue d'un accès palustre grave tels que CIDR2 β [170], DC5 [79], DC8 et DC13 [82] ou capables de désorganiser les structures de *rosetting* [188] via leur interaction avec le domaine NTS-DBL1 α [167], [189], [190], a été considérée comme un facteur de protection notamment vis-à-vis du neuropaludisme. Le domaine intracellulaire de

PfEMP1, moins soumis à des variations de séquence que les domaines extracellulaires, est également plus facilement reconnu par la réponse anticorps de l'hôte [160].

- La formation d'un complexe PfEMP1-anticorps à la surface des globules rouges parasités facilite également la clairance parasitaire en favorisant les mécanismes d'opsonisation et de phagocytose par les cellules du système réticulo-endothélial [187], [191]. Ce phénomène de phagocytose des globules rouges parasités, mis en évidence *in vitro*, est préférentiellement rencontré pour les formes parasitaires matures avec une forte densité en protéines PfEMP1 présentes à leur surface et semble être majoré en présence d'immunoglobulines G d'isotypes IgG1 et IgG3 protecteurs chez des patients immuns [192]. Dans une moindre mesure, l'élimination des globules rouges parasités peut également être liée à l'activation de la voie classique du complément par les anticorps opsonisants [187].

3. Les effets immunomodulateurs de *Plasmodium falciparum*

Face à la réaction immunitaire développée par l'hôte suite à l'infection palustre, *Plasmodium falciparum* a également mis en place certains mécanismes de résistance lui permettant de contourner, de limiter voire d'inhiber cette réponse immunitaire protectrice.

Ses mécanismes d'échappement à cette réponse humorale se traduisent par exemple par une diminution de la réactivité de la réponse lymphoproliférative et par un déficit en lymphocytes circulants lors d'un accès palustre grave qui peuvent revenir à la normale en phase de convalescence mais également favoriser une infection palustre ultérieurement chez certains patients [193]. Ce risque accru de réinfection après un accès palustre grave a également été décrit chez des enfants au Gabon dont la synthèse et la persistance d'IgG générées après un accès palustre grave étaient modifiées laissant entrevoir une tolérance immunologique au parasite chez ces enfants [194], [195]. L'altération des fonctions des lymphocytes B est

également un mécanisme utilisé par le parasite pour survivre chez l'hôte : elle se traduit entre autre par une activation polyclonale des lymphocytes B via le domaine CIDR1 α de *Plasmodium falciparum* associée à une hyperproduction d'immunoglobulines non spécifique lors d'un accès palustre grave [196]. Ce processus permet au parasite de retarder le développement d'une réponse immunitaire humorale efficace et entraîne en parallèle la production d'autoanticorps dirigés contre divers antigènes de l'hôte infecté [196] qui peuvent persister et être à l'origine d'atteintes viscérales secondaires [197]. Les globules rouges parasités induisent, au cours de la réponse inflammatoire, une augmentation de la sécrétion de *B cell activating factor family* (BAFF), cytokine indispensable à la survie et à la différenciation des lymphocytes B. Cette augmentation de production de BAFF plasmatique est associée à la sévérité de l'infection et régule négativement l'expression des récepteurs BAFF à la surface des lymphocytes ce qui réduit l'effet de cette cytokine, participe à l'altération de la fonction des lymphocytes B [196], [198] et au développement d'une réponse mémoire en favorisant la formation de cellules B mémoire atypiques [196].

Chapitre 2 : Problématique et objectifs de thèse

Le paludisme d'importation est une entité épidémiologique aux différentes présentations cliniques plus ou moins associées au risque de mortalité, observée dans une population hétérogène de patients, composée de voyageurs originaire de France ou de zone d'endémie, d'adultes ou d'enfants, d'origine africaine ou caucasienne pour lesquels la notion d'un contact antérieur avec *Plasmodium falciparum* est très variable. De nombreuses études réalisées dans le contexte de paludisme d'importation, en France ou en Europe, ont tenté d'identifier les facteurs de risque de développer un accès palustre grave dans cette population et ont permis de mieux caractériser les signes cliniques et biologiques très fortement associés à la mortalité dans l'accès palustre grave d'importation. Cependant, malgré l'utilisation du score de gravité de l'OMS de 2000 [20] pour caractériser l'accès palustre grave, les patients étudiés dans les différents travaux n'étaient pas équivalents aboutissant à des résultats discordants. Ainsi, selon la méthodologie appliquée et les groupes de patients étudiés, l'origine caucasienne des patients [5]–[7], [25], [27], l'âge des patients [5]–[7], [23], [199], la zone d'endémie visitée [6], [7] et le délai de prise en charge du patient [6], [7] semblent être les principaux facteurs de risque de la survenue d'un accès palustre grave d'importation. Le neuropaludisme [23]–[27], l'œdème pulmonaire [24], [26], [27], l'état de choc [23], [26], [27], l'acidose métabolique [23], [25]–[27] et l'hyperparasitémie [5], [23], [25] restent les critères de gravité cliniques et biologiques les plus fortement associés à la mortalité dans le paludisme d'importation. Néanmoins, ces précédentes études présentent certaines limites en ne prenant pas en compte le statut sérologique des patients vis-à-vis de plasmodium, reflet de l'exposition au parasite et potentiellement impliqué dans la protection vis-à-vis des formes graves [62]. La description du nouveau biomarqueur parasitaire PfHRP2 plasmatique pour caractériser l'accès palustre grave [56]–[58] a également permis de mieux classer les cas de

paludisme grave chez les enfants en zone d'endémie mais, à l'heure actuelle, ce biomarqueur parasitaire n'a pas été utilisé dans le paludisme grave d'importation.

Par ailleurs, l'expression de certains groupes de gènes *var* semble être fortement corrélée à la présentation clinique chez les populations étudiées résidant en zone d'endémie. Alors que les gènes des groupes B et C sont davantage exprimés dans les formes simples et asymptomatiques de l'infection chez les patients de plus de 15 ans [111], [112], un sous-groupe restreint de gènes *var* du groupe A et B/A, de structure plus ou moins conservée dont ceux codant pour les domaines cassettes DC8 et DC13, est impliqué dans la survenue de l'atteinte neurologique liée à l'infection palustre grave chez l'enfant de moins de 5 ans en zone d'endémie [80]–[83], [112]–[114], [116]. D'autres domaines cassettes des gènes du groupe A et B/A tel que DC4 et DC5 ont également été décrits mais leur implication semble moindre et nécessite d'être confirmée [78], [79]. Ces observations sont néanmoins contradictoires entre les différentes zones d'endémie (Afrique et Asie du Sud-Est) et les groupes de patients étudiés (âge, exposition) puisque certains gènes du groupe B ont également été retrouvés surexprimés dans les formes graves de l'infection à *Plasmodium falciparum* [112], [118]. L'ensemble de ces données confirment la complexité des interactions entre l'hôte et le parasite qui conditionnent l'expression des gènes *var* au cours de l'accès palustre. Dans le cadre du paludisme d'importation, il n'existe à notre connaissance aucune donnée publiée sur la nature et le niveau d'expression des gènes *var* selon les catégories de patients qui pourraient expliquer le panel de signes cliniques et biologiques observés. Les données publiées sur l'expression de ces gènes *var* et des domaines cassettes correspondants n'ont pas été validées chez d'autres populations susceptibles à l'infection palustre grave telles que les voyageurs et les migrants africains résidant en France.

La cytoadhérence, les phénomènes de *rosetting* et de *clumping* sont à la base de la séquestration parasitaire du globule rouge parasité, nécessaires à sa survie mais délétères pour

l'hôte par la réduction du flux sanguin et l'hypoperfusion d'organes qui en résulte. Un très grand nombre de récepteurs de l'hôte ont été décrits comme plus ou moins impliqués dans ce mécanisme de cytoadhérence mais seuls CD36, ICAM-1 pour la cytoadhérence et les phénomènes de *rosetting* ont été plus largement étudiés *in vitro* et fortement associés à la survenue d'un accès palustre grave chez les enfants en zone d'endémie. Néanmoins, il n'y a pas de données publiées sur les phénotypes de cytoadhérence des isolats de *Plasmodium falciparum* dans le paludisme d'importation. La découverte récente de l'implication d'EPCR dans la séquestration parasitaire lors du neuropaludisme a élargi le panel de récepteurs d'hôte impliqués dans ce phénomène et a relancé les recherches sur l'existence d'autres récepteurs potentiellement impliqués dans la cytoadhérence et le *rosetting*. A notre connaissance, peu de données existe sur l'interaction entre PfEMP1 et EPCR et peu d'études ont investigué la cytoadhérence parasitaire sur ce récepteur [91], [140]. L'étude du phénotype de cytoadhérence des souches de *Plasmodium falciparum* dans un contexte de paludisme d'importation permettrait d'explorer les mécanismes physiopathologiques à l'origine des présentations cliniques de l'accès palustre. De plus, la cytoadhérence à EPCR n'a été que peu étudiée dans ce contexte et n'a pas encore été validées chez des populations à risque d'atteintes neurologiques.

I. Objectifs de la thèse

Mes travaux de thèse se sont principalement focalisés sur l'analyse des facteurs d'hôte et des facteurs parasitaires impliqués dans le paludisme grave d'importation. Dans ce but, mes travaux se sont articulés autour de 3 principaux objectifs :

- Description des caractéristiques épidémiologiques, démographiques, cliniques et biologiques des patients à risque de développer un paludisme grave d'importation. Intérêt du dosage de la PfHRP2 plasmatique et du calcul des biomasses parasitaires pour la validation d'une nouvelle classification du paludisme grave d'importation.
- Etude de l'expression des gènes *var* et des domaines cassettes DC4, DC5, DC8 et DC13 de *P. falciparum* dans les isolats collectés à partir des patients ayant présenté un paludisme d'importation. L'objectif est d'identifier une expression particulière de gènes ou groupes de gènes *var* associée à un groupe à risque de développer un accès grave versus un accès simple.
- Caractérisation *in vitro* des phénotypes de *rosetting* et de cytoadhérence d'isolats de *Plasmodium falciparum* sur les récepteurs CD36, ICAM-1, EPCR au cours de l'accès palustre et corrélation de ces données avec le niveau d'expression des gènes *var* des même isolats.

II. Cadre de l'étude

1. Réseau du centre national de référence du paludisme

L'ensemble de mes travaux de recherche se sont déroulés au laboratoire du CNR du paludisme sur le site de l'hôpital Bichat-Claude Bernard (Directrice : Professeur Sandrine Houzé). La collecte des données épidémiologiques, cliniques et biologiques a été réalisée via le réseau national de surveillance du paludisme d'importation organisé autour du CNR du paludisme. Ce réseau, composé d'environ 80 correspondants hospitaliers en France

métropolitaine, permet la surveillance des cas de paludisme d'importation, et chaque correspondant assure, de manière prospective, la notification des nouveaux cas de paludisme d'importation diagnostiqués en France métropolitaine sur une base de données informatique partagée et sécurisée [4]. Le prélèvement sanguin ayant permis le diagnostic (J0) est envoyé, parallèlement, dans un délai optimal de 48 à 72 heures, au laboratoire du CNR du paludisme pour expertise.

2. Diagnostic parasitologique au laboratoire du CNR

Le diagnostic d'espèce et la densité parasitaire sont déterminés à partir de chaque prélèvement sanguin J0 par microscopie (frottis sanguin et goutte épaisse). La parasitémie est estimée en nombre de parasites par μl en estimant un nombre moyen de globules rouges de $4.5.10^6/\mu\text{l}$.

En cas de très faible densité parasitaire ou de discordance entre les techniques de frottis sanguin et de goutte épaisse, une PCR nichée selon la technique décrite par Snounou et *al.*, [44], [45] est réalisée pour le diagnostic d'espèce sur l'ADN parasitaire extrait à partir du sang total.

Pour chaque prélèvement J0, le plasma est récupéré après centrifugation et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

3. Critères d'inclusion des échantillons/patients

Pour l'ensemble de ces travaux, les principaux critères d'inclusion choisis ont été: patients ne résidant pas en zone d'endémie palustre, à part les patients expatriés français, avec des données disponibles, infection par l'espèce *P. falciparum* confirmée par le laboratoire du CNR du paludisme, échantillon sanguin J0 disponible en quantité suffisante au laboratoire du CNR et absence de traitement curatif dans les 30 jours précédents le diagnostic, confirmée par le dosage plasmatique des principaux antipaludéens à J0.

Les patients inclus pour les différents travaux de ce projet de thèse ont été classés en 3 principaux groupes : les migrants de première génération (MPG) (nés en zone d'endémie et résidants en France), les migrants de deuxième génération (MSG) (nés en France de parents migrants et résidants en France) et les voyageurs/expatriés (nés en France et résidants en France ou en zone d'endémie (expatriés)).

Par ailleurs, les cas de paludisme ont également été classés en deux groupes : les accès palustres graves (APG) définis selon la définition de l'OMS [20] et les accès palustres simples (APS) définis par la présence de formes parasitaires circulantes accompagnées de fièvre, sans aucun signe de gravité clinique et/ou biologique.

De plus, suivant les recommandations pour la prise en charge du paludisme d'importation en France revues en 2007 [21], les cas de paludisme grave ont été divisés en deux groupes : les cas de paludisme « très graves » (PTG) définis par une dysfonction d'organes, un état de choc ou une hyperlactatémie et les cas de paludisme « graves » (PG) définis par la présence d'une hyperparasitémie isolée ou associée à un ictère, une anémie ou une hémoglobinurie sans atteinte d'organes, ni état de choc.

RESULTATS

Chapitre 1

**Limitation de la séquestration de *P. falciparum* après pré
exposition au parasite dans le paludisme d'importation en France**

L'accès palustre grave à *Plasmodium falciparum*, potentiellement mortel chez les enfants de moins de cinq ans en zone d'endémie, est principalement caractérisé par la séquestration dans les organes profonds des globules rouges parasités. Ce phénomène est la conséquence de leur cytoadhérence aux récepteurs des cellules endothéliales de l'hôte, médiée par une protéine parasitaire, la *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1). Une exposition répétée aux antigènes de *P. falciparum* durant l'enfance permet le développement d'une réponse immunitaire qui limite la séquestration parasitaire chez l'adulte. Cette immunité « de prémunition » reste néanmoins fragile et nécessite une exposition continue pour se maintenir.

La France est le premier pays non endémique exposé au risque de paludisme d'importation en Europe. Ces cas de paludisme sont observés dans une population hétérogène de patients composée de voyageurs et de migrants d'origine africaine et avec différentes présentations cliniques plus ou moins associées à un risque de mortalité. L'hypothèse de l'absence ou de la perte de l'immunité « protectrice », qui pourrait expliquer la susceptibilité de ces populations aux formes graves de l'infection palustre, est désormais controversée.

Les caractéristiques démographiques, épidémiologiques et immunologiques des populations qui présentent un paludisme d'importation sont très différentes des populations atteintes en zone d'endémie et les facteurs de risque associés à la mortalité dans les accès palustres graves importés sont peu connus.

L'objectif de cette étude était d'identifier les facteurs épidémiologiques, cliniques et biologiques associés à la survenue d'un accès palustre grave dans le cadre du paludisme d'importation. A partir de l'échantillon sanguin du diagnostic parasitologique initial reçu au CNR du Paludisme, les taux plasmatiques d'HRP2, biomarqueur parasitaire spécifiquement sécrété par *Plasmodium falciparum* et le statut sérologique des patients ont été déterminés. Les données épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients dont les échantillons ont

été étudiés, ont été collectées via le réseau de correspondants hospitaliers du CNR du paludisme. Les patients étaient des migrants de première génération, des migrants de deuxième génération et des voyageurs/expatriés.

L'étude des données épidémiologiques, cliniques et biologiques de 333 patients infectés par *P. falciparum* dans un contexte de paludisme d'importation, avait permis d'identifier des différences d'âge, d'origine ethnique, de pré-exposition au parasite, de statut sérologique, de concentrations en HRP2 et de biomasse parasitaire entre les cas de paludisme grave versus les cas de paludisme simple d'importation. Une biomasse parasitaire séquestrée élevée était un facteur de risque de développer un accès palustre « très grave » alors qu'une sérologie positive était un facteur de risque de développer un accès palustre simple.

Ce travail avait mis en évidence l'importance de la pré-exposition à *Plasmodium falciparum* dans le contexte du paludisme d'importation qui permettrait l'acquisition d'une protection vis-à-vis de l'accès palustre grave en limitant la séquestration parasitaire. L'hypothèse d'une protection à long terme contre les accès palustres graves a été suggérée par ces observations.

Un manuscrit pour la publication de ces résultats a été soumis au journal *Emerging Infectious Diseases* et la décision de l'éditeur est en attente (date de soumission : 17/03/2015).

Limitation of *Plasmodium falciparum* Sequestration in French Imported Malaria by Preexposure to Parasite (Article soumis).

Nicolas Argy, Eric Kendjo, Veronique Hubert, Claire Augé-Courtois, Sandrine Cojean, Jerome Clain, Philippe Deloron, Sandrine Houzé and the FNRCM¹ study group.

Author affiliations:

Centre hospitalo-universitaire Bichat-Claude Bernard, APHP, Paris, France (N. Argy, S. Houzé); Centre national de référence du paludisme, Paris (N. Argy, E. Kendjo, V. Hubert, S. Cojean, J. Clain, S. Houzé); UMR 216, IRD, Paris (N. Argy, C. Augé-Courtois, J. Clain, P. Deloron, S. Houzé); and Université Paris Descartes, Paris (N. Argy, C. Augé-Courtois, J. Clain, P. Deloron, S. Houzé)

¹Additional members of FNRCM study group who contributed are listed at the end of this article.

Article summary line: Limitation of Parasite Sequestration by “Long-Term” Immunity Prevents Severe Malaria in an Imported Malaria Context.

Running title: Severe Imported Malaria, France

Keywords: preexposure, *Plasmodium falciparum*, immunity, imported malaria, sequestration, parasite biomass, severe malaria

Abstract

French imported malaria is characterized by various clinical manifestations observed in a heterogeneous population of patients, travelers and African migrants. In this population, risk factors associated with high mortality in severe imported malaria are not well known. We set out to identify epidemiological, clinical and biological features associated with very severe malaria in these patients from patient data collected by the French National Reference Center of Malaria (FNRCM). The influence of age, ethnicity, absence of previous infection with *P. falciparum*, plasmodial serologic status, PfHRP2 plasma levels and parasite burden on severe malaria onset was identified. High sequestered parasite burden is clearly associated with very severe malaria forms while in uncomplicated malaria, “long-term” immunity, resulting from preexposure to *Plasmodium falciparum*, appears to limit parasite sequestration, protecting patients against severe malaria and mortality.

Plasmodium infection represents a major public health problem in tropical regions causing around 584,000 deaths with more than 90% of these occurring on the African continent (1,2). Severe malaria is the consequence of parasitized red blood cell sequestration (pRBC) in the microcirculation with cytoadherence via host endothelial receptors, mediated by *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1) (3,4). Repeat exposure to *P. falciparum* antigens during childhood appears necessary to induce a non-sterilizing antibody-mediated response against antigenic variants of PfEMP1, preventing parasite sequestration in adults (5,6). However, this strain-transcending immunity is fragile, maintained by continuous exposure (6).

Parasitic biomarkers, such as histidine-rich protein 2 (PfHRP2), have been evaluated in Southeast Asia (3) and in Africa (7,8) to improve the definition of severe malaria in malaria-endemic areas. Levels of PfHRP2, specifically produced by *P. falciparum* and released by schizonts, appear to better reflect the total parasite biomass, including the sequestered component, than parasite density in peripheral blood (3).

In 2013, approximately 4,100 imported malaria cases, 10% of which were severe cases (0.46% mortality rate), were diagnosed in France, the most exposed non-malaria-endemic country in Europe (9). These metropolitan French imported malaria cases were observed in patients, travelers or migrants from malaria-endemic areas, adults and children. Depending on various factors (10–12), patients present different clinical manifestations with or without severe malaria, which vary in their association with mortality (13–16). Because of the absent or waning immunity from lack of exposure to *P. falciparum*, travelers and African migrants have long been considered susceptible to severe malaria (17), but this observation became controversial with the hypothesis of “long-term” malarial immunity (18,19).

Demographic, epidemiological and immunological features of imported malaria are clearly different to those of endemic malaria and the resulting severe forms of malaria call into question the relevance of the WHO criteria in imported severe malaria. Based on the clinical description of cases (13–16, 20), we aimed to identify epidemiological, clinical and biological features associated with severe or non-severe malaria, including evaluation of PfHRP2 plasma levels and parasite biomass.

Methods:

Data sources and sample collection

This study was conducted in the French National Reference Center of Malaria laboratory (FNRCM lab) at Bichat hospital, between 2010 and 2013. The FNRCM, through its national network of hospital laboratories, monitors imported malaria in metropolitan France by prospective notification of diagnosed malaria cases. For each case, demographic, epidemiological, biological and clinical data are entered in a database by the corresponding center, and the blood sample used for the initial parasitological diagnosis (D0 sample) is transmitted to the Bichat FNRCM lab. In our study, inclusion criteria were as follows: patients not living in malaria-endemic countries except French expatriates with available data, infection with *P. falciparum* species confirmed at FNRCM, D0 whole blood sample available in sufficient quantity at the FNRCM lab, and no curative or preventive malaria treatment in the 30 days before diagnosis, confirmed by plasma determination of main antimalarial drugs at D0.

Laboratory procedures

Plasmodium species and parasite density were determined from D0 samples on stained thin and thick blood films. Parasitemia was expressed as number of parasites per μl assuming a mean of 4,500,000 RBC/ μl . In the event of low parasite density or negative thin blood

smear, thick blood film combined with DNA extraction and nested-PCR (21) were performed. D0 plasma samples were stored at -20°C and used for antimalarial drug test, PfHRP2 assay and serologic testing.

Study population

Included patients were classified into 3 main groups: first-generation migrants (FGM) (born in malaria-endemic regions and living in France), second-generation migrants (SGM) (born in France from migrant parents and living in France), and travelers/expatriates (T/E) (born in France and living in France or in malaria-endemic regions). Malaria cases were classified into 2 groups: severe malaria (SM) defined according to the WHO definition (2), and uncomplicated malaria (UM) defined by the presence of asexual parasites and fever without any severity criteria. In addition, following the recommendations for the management of imported malaria in France reviewed in 2007 (20), SM cases were split into two groups: very severe malaria (VSM) defined by organ dysfunction, shock and hyperlactatemia and mild severe malaria (MSM) defined by the presence of isolated hyperparasitemia or associated with jaundice, anemia or hemoglobinuria but without shock or organ failure (Table 1).

PfHRP2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and estimation of total parasite biomass

PfHRP2 assays were performed with the Malaria Antigen Celisa® commercial kit (Cellabs®; Brookvale, Australia), as recommended by the manufacturer, on D0 diluted plasma according to the initial parasite density. PfHRP2 was quantified with the calibration curve obtained from three dilutions of the positive control. Samples with optical density values outside the range of the calibration were retested at an adapted dilution.

Total parasite biomass was estimated from the plasma PfHRP2 value, as described by Hendriksen *et al.* (8). Total parasite burden (P_{tot}) was estimated by the formula: $P_{tot} = 7.3 \times$

PfHRP2 (g/L) x (1-hematocrit) x body weight (kg) x 10^{13} . The circulating parasite burden (Pcirc) was calculated as follows: Pcirc = parasites/ μ l x 10^6 x blood volume. The blood volume was defined as 0.08 x body weight (kg). The sequestered parasite biomass (Pseq) corresponded to the difference between total and circulating parasite load.

Slide preparation and indirect immunofluorescence assay (IFA)

Presence and titers of total antibodies against *Plasmodium spp.* were determined by IFA with schizonts of 3D7 *P. falciparum* strain as antigens and anti-human IgG/A/M (Biorad®; Hercules, California, USA) as conjugate. Plasma dilutions from 1:16 to 1:65,536 were tested. Slides were examined under blinded conditions by two experienced microscopists. In the event of a discordant result, a third microscopist examined the slide in question under blinded conditions. For statistical analysis, antibody titers were pooled with 0 corresponding to a negative serologic test result, 1:64, 1:256 and 1:1,024 to a positive serologic test result and $\geq 1:4,096$ to a strong positive serologic test result.

Statistical analysis

To achieve sufficient statistical power, we randomly selected a sample of uncomplicated malaria cases to reach a roughly equivalent number to severe malaria cases. For the descriptive analysis, quantitative variables were represented by mean and standard deviation (SD) for normal distributions, and by median with the interquartile range [25%-75%] for non-normal distributions. Categorical variables were evaluated according to size and frequency. PfHRP2 and parasite biomass values were log-transformed. ANOVA and Kruskal-Wallis tests were used to compare the relation between continuous variables and groups when appropriated, χ^2 and Fisher's exact test for categorical variables between groups. For all these tests, the difference was considered significant when $p < 0.05$. All reported p values are two-tailed. Bonferroni's correction was performed for multiple comparisons

between continuous variables and groups. Logistic regression was performed to determine risk factors of positive serologic test results and severe malaria. Potential risk factors of these outcomes and significant variables in univariate analysis ($p < 0.05$) were tested in the model. A sub-analysis using multiple linear regression was also performed to identify influential factors of PfHRP2 and parasite burden. Statistical analyses were performed using STATA, version 12 (Stata corp®, College station, Texas, USA).

Results

Study population

333 *P. falciparum* imported malaria cases were included between 2010 and 2013. These cases comprised 138 SM cases (41.4%) and 195 UM cases (58.6%). Study process and sample management are presented in Figure 1. 215 patients were men (64.6%) and the mean age was 37.3 ± 16.3 years. 215 patients were FGM (64.6%), 66 were T/E (19.8%), and 52 SGM (15.6%) (Table 1). Imported cases of malaria came mainly from West (68.5%) (Benin, Burkina Faso, Ivory Coast, Gambia, Ghana, Guinea, Mali, Niger, Nigeria, Senegal, Sierra Leone, Togo) and Central Africa (26.4%) (Burundi, Cameroon, Central African Republic, Congo, Gabon, Equatorial Guinea, Zaire, Chad). The remaining cases were distributed among East Africa (1.5%) (Soudan, Uganda, Tanzania, Kenya, and Ethiopia), Indian Ocean (3%) (Comoros, Madagascar), while a single case originated from Haiti, and another from Laos (Table 1).

Clinical group characteristics

Clinical characteristics of the subgroups are presented in Table 1. According to our classification criteria, the SM group included 55 VSM cases (39.9%) and 83 MSM cases (60.1%). The median number of severity criteria at D0 was 3 [2-5] and 1 [1-1] in the VSM and MSM group respectively. In the VSM group, neurological disorders were observed in

55% of cases and coma in 2%. Shock (31%), respiratory failure (13%), renal failure (27%), hyperparasitemia (73%) and acidosis (13%) with hyperlactacidemia (31%) were also observed alone or combined. Patients with MSM had hyperparasitemia (79%), clinical jaundice and hyperbilirubinemia (58%) and severe anemia (5%). Patients in the SM group were older than patients suffering from UM ($p = 0.002$) especially in the VSM group compared to the MSM group ($p = 0.013$) and the UM group ($p = 0.001$) (Table 1). The proportions of FGM, SGM and T/E differed according to malaria severity, with a high proportion of FGM and SGM in the UM group whereas T/E were more common in the VSM and MSM groups ($p = 0.002$) (Table 1). Previous reported history of malaria were more frequent in UM than in VSM and MSM ($p = 0.03$) (Table 1). The delay between return from a malaria-endemic area and onset of symptoms did not differ between clinical groups ($p = 0.28$), contrary to the time of management ($p = 0.04$). There was a gradual, significant increase in platelets related to disease severity, from the VSM group to the UM group ($p < 0.01$ after Bonferroni's correction) (Table 1). Median parasite density was higher in SM than in UM ($p < 0.01$), but was similar between the VSM and MSM groups ($p = 1$) (Table 1).

PfHRP2 and parasite biomass determination

Quantification of PfHRP2 and calculation of parasite burden were performed for 315 patients including 132 SM cases (53 VSM and 79 MSM cases) and 183 UM cases (Figure 2).

LnPfHRP2 levels were higher in the SM group than in UM (7.2 ± 1.9 ng/ml vs. 5.5 ± 1.8 ng/ml respectively; $p < 0.001$). Statistical differences were also found between the three clinical subgroups (7.7 ± 1.8 ng/ml vs. 7 ± 1.9 ng/ml vs. 5.4 ± 1.8 ng/ml, respectively for VSM, MSM and UM; $p < 0.001$), as well as between VSM and UM ($p < 0.001$) and MSM versus UM ($p < 0.001$) (Figure 2).

Total (P_{tot}), circulating (P_{circ}) and sequestered (P_{seq}) parasite burden were estimated for 176 patients including 85 SM cases (37 VSM and 48 MSM) and 91 UM patients (Figure 3). Negative values were obtained in 35 patients (19.9%) through the limit of calculation formula (3,8). Here, we assumed, as described (3), that patients had few or no sequestered parasites and these negative values were considered 0 in Figure 3. Significant differences were observed for total and circulating parasite burden between SM and UM groups (29.4 ± 1.8 vs. 27.3 ± 1.7 for LnP_{tot}; $p < 0.001$ and 28 ± 1.2 vs. 25.9 ± 1.1 for LnP_{circ}; $p < 0.001$). Differences in total, circulating and sequestered parasite burden were shown for LnP_{tot}, LnP_{circ} and LnP_{seq} between VSM, MSM and UM clinical subgroups ($p < 0.03$). Bonferroni's correction confirmed higher total and circulating parasite burdens in VSM ($p < 0.001$) and MSM ($p < 0.001$) than in UM groups, with no difference being observed between VSM and MSM (Figure 3). Unexpectedly, the sequestered parasite burden was similar in SM and UM ($p = 0.3$). Sequestered parasite burden was similar both between VSM and MSM groups and between VSM and UM groups, but in both instances there was a trend (27.1 ± 8.4 vs. 21.2 ± 13.2 ; $p = 0.058$ and 27.1 ± 8.4 vs. 21.8 ± 11.4 ; $p = 0.054$ respectively).

Serologic status

Total plasma antibodies were determined for 329 patients (Figure 1) and classified as negative in 93 cases (28.3%), positive in 179 cases (54.4%), and strongly positive in 57 cases (17.3%).

The proportion of negative (41.5% vs. 22.9%) and positive serologic test results (40.2% vs. 60.4%) differed between MSM and UM groups ($p = 0.003$) (Figure 4). By contrast, no difference was found between VSM and UM groups ($p = 0.72$). With regard to malaria exposure, the FGM group presented the highest proportion of positive and strongly positive serologic test results as compared to the other two groups (both $p < 0.001$) (Figure 5). To

evaluate factors influencing serologic status, logistic regression with age class, clinical subgroups and exposed patient categories confirmed the association of UM with positive serologic test results (odds ratio 2.2 95% CI 1.2-4; $p=0.008$). In addition, SGM and T/E groups were associated with negative serologic test results (odds ratio 0.3 95% CI 0.1-0.6; $p = 0.002$ and odds ratio 0.3 95% CI 0.2-0.5; $p<0.001$ respectively) (Supplemented Table S1).

Risks factors for clinical severity

We first performed a logistic regression to determine the risk factors associated with very severe malaria. It demonstrated the influence of the burden of sequestered parasites (odds ratio 1.1 95% CI 1.0-1.1; $p = 0.014$) in the VSM group (Table 2).

Because LnPfHRP2 and parasite burden had a major influence on clinical status, a multivariate analysis was then performed to identify factors influencing PfHRP2 and parasite burden values. Linear regression revealed a negative influence of the UM group on LnPfHRP2, total and circulating parasite burden (both $p<0.001$) as well as negative serologic test results for LnPfHRP2 ($p = 0.004$) and total parasite burden ($p = 0.009$) (Table 3). The VSM group was associated only with a significant increase in sequestered parasite burden ($p = 0.01$). There was a slight correlation between positive serologic test results and increased circulating parasite burden ($p = 0.049$) whereas negative and positive serologic test results were associated with a strong decrease in sequestered parasite burden ($p = 0.005$ and $p = 0.009$ respectively).

Discussion

Clinical presentations in severe imported malaria vary depending on patient heterogeneity in terms of age, ethnicity and previous history of malaria (2,20). Through the FNRCM network and database, we analyzed a cohort of imported severe and non-severe malaria cases defined by the WHO criteria established in 2000 and still in force in France

(2,13–16,20) reaffirmed in 2013 despite revision of those criteria by WHO in 2010 (22). Subdivision into VSM and MSM groups allowed us to identify risk factors and implicated biological mechanisms in susceptible populations.

SM patients, and particularly VSM patients, are older (>40 years) (10–13,23,24), and differ in ethnicity (10–12,15,16), time of management (10,12), lack of previous history of malaria (11) and thrombocytopenia (25). Although these parameters were identified previously in imported malaria in France and Europe or in malaria-endemic regions, new parameters are correlated to severe malaria. Platelet count is not a WHO severity criterion, but we confirmed it is inversely correlated to the severity of infection particularly in older patients or those not previously infected with *P. falciparum* (25). Conversely, high parasite density showed no discrimination between VSM and MSM, suggesting it is not a risk factor for severity, as previously suggested (11,13,15). These criteria need to be taken into account for travel advice, and management of migrants and returning travelers.

Exposed patient categories are a known risk factor in severe imported malaria (10–12,15,16) and T/E patients are most susceptible to VSM. Although genetic factors are implied (11,12), absence of or low previous exposure to *P. falciparum* may represent the main risk factor. Contrary to FGM and SGM, evidence suggests that “naive” patients cannot control parasite multiplication (10–12,15,16) although data are contradictory (17,19). This hypothesis is corroborated by a high incidence of reported prior history of malaria in UM, especially among FGM, demonstrating a protective effect of previous exposure to *P. falciparum* against VSM and MSM (11). In this hypothesis, SGM are considered an intermediate exposure group. However, similar proportions of FGM and SGM in each clinical subgroup suggests that this population that returns frequently to malaria-endemic areas to visit family and friends should be frequently exposed to malaria at sufficient levels to confer protection against severe malaria independent of age at time of exposure (6,26). With a mean age of 15.8+/-11.7 years,

SGM have a mature immune system (27), so that age-related immunity is similar in all exposed patient groups, as opposed to the history of previous exposure to *P. falciparum*. These observations point toward rapid acquisition of protection against severe malaria in the imported malaria context as described in malaria-endemic regions (28) where host age is the main influential factor in naturally acquired immunity (29,30).

As previously described (3,7,8), PfHRP2 plasma concentrations correlated with the severity of malaria infection, being highest in SM; total and circulating parasite burdens follow the same trend (3,8). However, these markers behave similarly in VSM and MSM, limiting their use in the differentiation of severe forms. This limitation has been observed and discussed in a recent cohort of children in Africa, with the conclusion that mathematical modeling used to calculate PfHRP2 and parasite burden has limitations, and probably has to be redefined for each *P. falciparum* strain and population studied (3,8). However, lack of power of studies, variability in parasite virulence or other pathophysiological mechanisms could also impede detection of differences between clinical groups (3,8,31). Because we used the same methodology to estimate parasite burden, this bias likely also applies to our work.

Sequestered parasite burden is the only biomarker associated with severity and has an independent course of development compared to PfHRP2 and other parasite markers. In accordance with the work of Cunningham *et al.*, (32) sequestered parasite burden is similar in SM and UM in our imported malaria cohort, suggesting that parasite sequestration also occurs in UM but different adhesion phenotypes could be involved (4). Multivariate analysis confirms the influence of sequestered parasite burden on clinical group, and demonstrates that VSM is correlated to a high sequestered parasite biomass compared to MSM and UM, confirming the role of the sequestered parasite pattern in the clinical presentation of imported malaria.

We hypothesized that differential exposure to *Plasmodium falciparum* could originate differences between clinical subgroups. Paradoxically, while positive or strongly positive serologic test results for whole schizont stage are associated with mild malaria in the D0 sample, the VSM group also shows higher antibody titers, raising questions on the potential protective role of preexposure and antibodies generated in SM (33). Antibody detection is a useful biological tool for detecting previous exposure to *Plasmodium spp.* but not antimalarial protection, although the presence of higher antibody titers in FGM is associated with less frequent VSM. IFA provides quantitative but not qualitative information on the antibody response. Based on this, antibodies in the UM group could reflect a mature immune response against *P. falciparum* while an immature antibody response in the SM group would not correlate to control of parasite multiplication. An association between high antibody responses and protection against SM has been described in immigrant populations in Europe (34). As expected, FGM present the highest antibody titers and the hypothesis of probable “long-term” immunity in African people correlates with our results. Long-term protection after leaving malaria-endemic areas has already been suggested in the imported malaria context, but few biological data on immune responses are available (18,19) although studies using new immunological techniques identified memory B cells in travelers secreting antibodies many years after returning from malaria-endemic areas (35). As published (34), our study confirms the persistence of a positive serologic status in migrants after previous exposure to the parasite. By contrast, multivariate analysis identifies interactions between serologic status and parasite biomass, antibody titers are correlated with Pcirc but mostly with Pseq, where increased values are associated with increased antibody titers. This trend has already been observed and the authors concluded on the existence of a “short-lived” immune system requiring parasite stimulation to produce and maintain heterologous antibodies (36). In our population, we hypothesize that preexposure to *P. falciparum* rapidly induces “long-term”

immunity that prevents severe malaria by limiting sequestration or by favoring an adhesion phenotype switch. A precise study of this antibody repertoire in imported malaria needs to be conducted to better characterize panels of antibodies and major antigens conferring protection in imported SM.

Our study utilizing the FNRCM network is subject to limitations. Recording of imported malaria cases is estimated to be 52.4% complete, and the percentage of sample transmission after notification was 79.4% in 2013, leading to possible underestimation of certain clinical forms and categories of the exposed population in French imported malaria. Moreover, restriction of inclusion criteria with negative drug plasma levels considerably limits the number of patients, as chemoprophylaxis or self-medication were frequently detected. Non-exhaustive information is sufficient for notification of imported malaria cases to the FNRCM database, meaning that some data may not be available in some cases preventing calculation of parasite burden (Figure 1). Determination of PfHRP2 was not performed if sample volume was inadequate. Pediatric cases were not included in our study because of insufficient blood sample volume, leading to skewed recruitment for the second generation of migrant children with imported malaria (37).

In conclusion, our study of imported malaria confirms that the different clinical presentations may be the result of sequestered parasite burden and sequestration phenotype. Control of parasite sequestration by “long-term immunity” in migrant populations could result from previous exposure to *P. falciparum* malaria. These observations reinforce the vaccine possibilities for the prevention and treatment of severe malaria in susceptible patients.

We thank members of the FNRCM study group for their contribution in the collection of data: S. Matheron, E. Casalino and M. Wolff (Paris, France), A. Delaval (Aulnay-sous-bois, France), P. Agnamey (Amiens, France), R. Durand (Bobigny, France), J. E. Pilo and C. Rapp (Saint-mandé, France), J. F. Faucher (Besançon, France), B. Cuisenier (Dijon, France), I. Poilane and D. Bemba (Bondy, France), A. Roide (Paris, France) A. Debourgogne (Nancy, France), M. Thibault (Cergy-Pontoise, France), D. Toubas (Reims, France), P. Patoz (Tourcoing, France), L. Degentile (Angers, France), D. Pons (Clermont-Ferrand, France), J. P. Hurst (Le Havre, France), C. Lohmann (Mulhouse, France), M. L Bigel (Mantes-la-Jolie, France), N. Godineau (Saint-Denis, France), M. Thouvenin (Troyes, France), J. Dunand and N. Ait-Ammar (Boulogne-Billancourt, France), A. Angoulvant (Le Kremlin-Bicêtre, France), N. Dahane (Paris, France), M. Lefevre (Creil, France), J. B. Murat and C. Garnaud (Grenoble, France), E. Dannaoui (Paris, France), F. Botterel (Créteil, France), E. Dutoit (Lille, France), M. L. Dardé (Limoges, France), H. Ichou and C. Branger (Colombes, France), P. Penn (Le Mans, France), C. Angebault (Paris, France), F. Morio (Nantes, France), L. Bret (Orléans, France), M. Thellier and O. Mouri (Paris, France), E. Cateau (Poitiers, France), J. Y. Siriez and O. Fenneteau (Paris, France), M. Revest and S. Belaz (Rennes, France), G. Belkadi (Paris, France), S. Hamane, S. Bretagne and P. Houzé (Paris, France), A. Aboubacar (Strasbourg, France), G. Leloup and M. Develoux (Paris, France), H. Lapillonne (Paris, France), O. Eloy (Le Chesnay, France), G. Nevez (Brest, France), D. Raffenot (Chambéry, France), B. Buret (Niort, France), G. Desoubeaux (Tours, France), and A. Goepp (Villeneuve Saint-Georges, France).

Acknowledgements:

We thank Vincent Samson, Florianne Ferreira, Maribel Rodriguez-Gutierrez and Camille Moisant for the technical support and Michel Cot for the manuscript revision.

Biographical sketch:

Nicolas Argy is a doctoral student and a biologist at the MERIT Unit UMR 216, IRD and at French National Reference Center of Malaria in Bichat-Claude Bernard hospital, Paris, France. His research interest is the pathophysiology of host-parasite interactions in severe malaria.

1. World Health Organization. World malaria report 2014 [cited 2014 Dec 9]. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/
2. World Health Organization. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94:S1–90.
3. Dondorp AM, Desakorn V, Pongtavornpinyo W, Sahassananda D, Silamut K, Chotivanich K, et al. Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2. *PLoS Med.* 2005;2:e204.
4. Smith JD, Rowe JA, Higgins MK, Lavstsen T. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell Microbiol.* 2013;15:1976–83.
5. Barragan A, Kremsner PG, Weiss W, Wahlgren M, Carlson J. Age-related buildup of humoral immunity against epitopes for rosette formation and agglutination in African areas of malaria endemicity. *Infect Immun.* 1998;66:4783–7.
6. Doolan DL, Dobaño C, Baird JK. Acquired immunity to malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:13–36.
7. Rubach MP, Mukemba J, Florence S, John B, Crookston B, Lopansri BK, et al. Plasma *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein-2 concentrations are associated with malaria severity and mortality in Tanzanian children. *PloS One.* 2012;7:e35985.
8. Hendriksen ICE, Mwanga-Amumpaire J, von Seidlein L, Mtove G, White LJ, Olaosebikan R, et al. Diagnosing severe falciparum malaria in parasitaemic African children: a prospective evaluation of plasma PfHRP2 measurement. *PLoS Med.* 2012;9:e1001297.

9. Centre National de Référence du Paludisme pour la France métropolitaine. Annual reports [cited 2014 Oct 22] [in French]. <http://www.cnrpalu-france.org/pages/rapports-annuels/>
10. Checkley AM, Smith A, Smith V, Blaze M, Bradley D, Chiodini PL, et al. Risk factors for mortality from imported falciparum malaria in the United Kingdom over 20 years: an observational study. *BMJ*. 2012;344:e2116.
11. Phillips A, Bassett P, Zeki S, Newman S, Pasvol G. Risk factors for severe disease in adults with falciparum malaria. *Clin Infect Dis*. 2009;48:871–8.
12. Seringe E, Thellier M, Fontanet A, Legros F, Bouchaud O, Ancelle T, et al. Severe imported *Plasmodium falciparum* malaria, France, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:807–13.
13. Bruneel F, Tubach F, Corne P, Megarbane B, Mira J-P, Peytel E, et al. Severe imported falciparum malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PloS One*. 2010;5:e13236.
14. Marks ME, Armstrong M, Suvari MM, Batson S, Whitty CJM, Chiodini PL, et al. Severe imported falciparum malaria among adults requiring intensive care: a retrospective study at the hospital for tropical diseases, London. *BMC Infect Dis*. 2013;13:118.
15. González A, Nicolás JM, Muñoz J, Castro P, Mas J, Valls ME, et al. Severe imported malaria in adults: retrospective study of 20 cases. *Am J Trop Med Hyg*. 2009;81:595–9.
16. Bruneel F, Hocqueloux L, Alberti C, Wolff M, Chevret S, Bédos J-P, et al. The clinical spectrum of severe imported falciparum malaria in the intensive care unit: report of 188 cases in adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:684–9.

17. Jennings RM, DE Souza JB, Todd JE, Armstrong M, Flanagan KL, Riley EM, et al. Imported *Plasmodium falciparum* malaria: are patients originating from disease-endemic areas less likely to develop severe disease? A prospective, observational study. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:1195–9.
18. Pistone T, Diallo A, Mechain M, Receveur M-C, Malvy D. Epidemiology of imported malaria give support to the hypothesis of “long-term” semi-immunity to malaria in sub-Saharan African migrants living in France. *Travel Med Infect Dis.* 2014;12:48–53.
19. Bouchaud O, Cot M, Kony S, Durand R, Schiemann R, Ralaimazava P, et al. Do African immigrants living in France have long-term malarial immunity? *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:21–5.
20. Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, Société Française de Médecine des Armées, Société Française de Parasitologie, Société Française de Pédiatrie, Société de Médecine des Voyages, et al. Management and prevention of imported *Plasmodium falciparum* malaria (Revision 2007 of the 1999 Consensus Conference) [in French]. *Med Mal Infect.* 2008;38:68–117.
21. Snounou G, Viriyakosol S, Jarra W, Thaithong S, Brown KN. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;58:283–92.
22. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria 2010 [cited 2014 Dec 9]. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/>

23. Mühlberger N, Jelinek T, Behrens RH, Gjørup I, Coulaud JP, Clerinx J, et al. Age as a risk factor for severe manifestations and fatal outcome of falciparum malaria in European patients: observations from TropNetEurop and SIMPID Surveillance Data. *Clin Infect Dis.* 2003;36:990–5.
24. Baird JK, Masbar S, Basri H, Tirtokusumo S, Subianto B, Hoffman SL. Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis.* 1998;178:592–5.
25. Lampah DA, Yeo TW, Malloy M, Kenangalem E, Douglas NM, Ronaldo D, et al. Severe Malarial Thrombocytopenia: A Risk Factor for Mortality in Papua, Indonesia. *J Infect Dis.* 2015; 211:623-34.
26. Guinovart C, Dobaño C, Bassat Q, Nhabomba A, Quintó L, Manaca MN, et al. The role of age and exposure to *Plasmodium falciparum* in the rate of acquisition of naturally acquired immunity: a randomized controlled trial. *PloS One.* 2012;7:e32362.
27. Kurtis JD, Mtalib R, Onyango FK, Duffy PE. Human resistance to *Plasmodium falciparum* increases during puberty and is predicted by dehydroepiandrosterone sulfate levels. *Infect Immun.* 2001;69:123–8.
28. Gupta S, Snow RW, Donnelly CA, Marsh K, Newbold C. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat Med.* 1999;5:340–3.
29. Baird JK, Jones TR, Danudirgo EW, Annis BA, Bangs MJ, Basri H, et al. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;45:65–76.

30. Baird JK. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today*. 1995;11:105–11.
31. Gonçalves BP, Huang C-Y, Morrison R, Holte S, Kabyemela E, Prevots DR, et al. Parasite burden and severity of malaria in Tanzanian children. *N Engl J Med*. 2014 8;370:1799–808.
32. Cunnington AJ, Bretscher MT, Nogaro SI, Riley EM, Walther M. Comparison of parasite sequestration in uncomplicated and severe childhood *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect*. 2013;67:220–30.
33. Erunkulu OA, Hill AV, Kwiatkowski DP, Todd JE, Iqbal J, Berzins K, et al. Severe malaria in Gambian children is not due to lack of previous exposure to malaria. *Clin Exp Immunol*. 1992;89:296–300.
34. Moncunill G, Mayor A, Jiménez A, Nhabomba A, Casas-Vila N, Puyol L, et al. High antibody responses against *Plasmodium falciparum* in immigrants after extended periods of interrupted exposure to malaria. *PloS One*. 2013;8:e73624.
35. Ndungu FM, Lundblom K, Rono J, Illingworth J, Eriksson S, Färnert A. Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. *Eur J Immunol*. 2013;43:2919–29.
36. Bull PC, Lowe BS, Kaleli N, Njuga F, Kortok M, Ross A, et al. *Plasmodium falciparum* infections are associated with agglutinating antibodies to parasite-infected erythrocyte surface antigens among healthy Kenyan children. *J Infect Dis*. 2002;185:1688–91.
37. Castéla F, Legros F, Lagardère B. [Imported malaria in children in France]. *Arch Pediatr*. 2003;10:758–65.

Address for correspondence:

Nicolas Argy, Centre Hospitalo-Universitaire Bichat-Claude Bernard, APHP, 46 rue Henri
Huchard, 75018 Paris, France.

Tel: +33140257819

Fax: +33140256763

Mail: nicolas.argy@gmail.com

Table 1 : Demographic, epidemiological, clinical and biological data from 333 imported malaria patients comprising 55 very severe malaria, 83 mild severe malaria and 195 uncomplicated malaria cases from 2010 to 2013, France

	SM* (n= 138)		UM* (n= 195)	P value	Total (n=333)
	VSM* (n= 55)	MSM* (n= 83)			
Demographic data					
Age (years)†	44.4 ±17	36.3 ±14.8	35.7 ±16.3	0.002	37.3±16.3
Men	36 (65.4)	51 (61.4)	128 (65.6)	0.8	215 (64.6)
Women	19 (34.6)	32 (38.6)	67 (34.4)		118 (35.4)
1 st generation migrant	31 (56.4)	50 (60.2)	134 (68.7)	0.002	215 (64.6)
2 nd generation migrant	5 (9.1)	11 (13.3)	36 (18.5)		52 (15.6)
Travelers/expatriates	19 (34.6)	22 (26.5)	25 (12.8)		66 (19.8)
Epidemiological data					
West Africa	32 (58.2)	53 (63.9)	143 (73.3)	0.09	228 (68.5)
Central Africa	18 (32.7)	24 (28.9)	46 (23.6)		88 (26.4)
East Africa	1 (1.8)	1 (1.2)	3 (1.5)		5 (1.5)
Indian Ocean	3 (5.4)	4 (4.8)	3 (1.5)		10 (3)
Caribbean	0 (0)	1 (1.2)	0 (0)		1 (0.3)
Asia	1 (1.8)	0 (0)	0 (0)		1 (0.3)
Clinical data					
History of malaria§	8 (21.6)	13 (19.4)	50 (35.7)	0.03	71 (29)
Immunosuppression¶	6 (11)	7 (8)	7 (4)	0.06	20 (6)
Onset of symptoms (days)‡	3 [0-8]	3 [0-8]	3 [0-9]	0.28	3 [0-9]
Time management (days)‡	4 [2-6]	3 [2-5]	3 [2-4]	0.04	3 [2-5]
Neurological dysfunction	30 (55)	0 (0)	0 (0)	NA	NA
Coma	1 (2)	0 (0)	0 (0)		
Shock	17 (31)	0 (0)	0 (0)		
Respiratory failure	7 (13)	0 (0)	0 (0)		
Hemorrhagic syndrome	1 (2)	1 (1)	0 (0)		
Hemoglobinuria	4 (7)	7 (9)	0 (0)		
Jaundice	19 (35)	12 (15)	0 (0)		
Biological data					
Platelets (Giga/l)‡	37 [21-69]	65.5 [41.5-107.5]	96 [64-142]	0.0001	81.5 [47-127]
Parasitemia (parasites/µl)‡	360,000 [135,000-720,000]	270,000 [180,000-450,000]	45,000 [18,000-72,000]	0.0001	72,000 [31,500-225,000]
Acidosis (pH<7.35)	7 (13)	0 (0)	0 (0)	NA	NA
Hyperlactacidemia (>2.2 mmol/l)	27 (31)	0 (0)	0 (0)		
hyperparasitemia (>180,000 parasite/µl)	40 (73)	65 (79)	0 (0)		
Anemia (Hb<8 g/dl)	3 (5)	4 (5)	0 (0)		
Creatinine (>265 µmol/l)	15 (27)	0 (0)	0 (0)		
Hypoglycemia (<2.2 mmol/l)	2 (4)	0 (0)	0 (0)		
Hyperbilirubinemia (>50µmol/l)	24 (44)	14 (58)	0 (0)		
Severe criteria‡	3 [2-5]	1 [1-1]	NA	NA	NA

* Imported malaria patients are classified into 3 clinical subgroups defined as uncomplicated malaria (UM) and 2 severe malaria (SM) subgroups: very severe malaria (VSM) and mild severe malaria (MSM).

†Normally distributed variables are represented by their mean ± standard deviation (SD) contrary to the remaining data which are presented as absolute numbers (%). NA, not applicable.

‡Variables of non-normal distributions are represented as median [25th percentile-75th percentile]. The onset of symptoms corresponds to the number of days between the return from endemic regions and the onset of clinical symptoms. The time of

management corresponds to the number of days between the onset of symptoms and the biological diagnosis in hospital centers. In our cohort, start of treatment corresponds to the day of the biological diagnosis.

§existence of a prior reported malaria infection

¶immunosuppressive status includes HIV infection (95%) and iatrogenic immunosuppression (5%).

Table 2: Relationship between very severe malaria and sequestered parasite burden by logistic regression in French imported malaria, 2010-2013*

VSM	Variable	OR	[95% CI]	P value
	age	1.03	[1.0-1.1]	0.06
	FGM	1.00 (reference)		
	SGM	0.9	[0.2-3.9]	0.9
	T/E	1.9	[0.8-5.0]	0.17
	Strongly positive serologic test result	1.00 (reference)		
	positive serologic test result	1.4	[0.4-4.8]	0.6
	negative serologic test result	1.6	[0.5-4.8]	0.44
	LnPseq	1.1	[1-1.1]	0.014

*the logistic regression was performed on 176 patients. Age, malaria exposure (first generation of migrant (FGM), second generation of migrant (SGM) and travelers/expatriates (T/E)), serologic test status (negative, positive and strongly positive serologic test result) and log-transformed sequestered parasite burden (LnPseq) were selected as potential risk factors after univariate analysis. FGM and strongly positive serologic test result were chosen as reference. Age and LnPseq were treated as continuous variables. LnPfHRP2, LnPtot and LnPcirc were not included in this model because of an interdependent relationship revealed by a correlation matrix (Supplemented Table S2). Significance was set to p value<0.05. OR, odds ratio; CI, confidence interval.

Table 3: Factors related to PfHRP2, total parasite burden (Ptot), circulating parasite burden (Pcirc) and sequestered parasite burden (Pseq) by linear regression in French imported malaria, 2010-2013*

	Variable	Coefficient	Standard error	P value
LnPfHRP2	Age	0.0007	0.008	0.93
	Clinical subgroup (reference: MSM)			
	VSM group	0.6	0.33	0.085
	UM group	-1.6	0.25	<0.001
	Exposed patient group (reference: FGM)			
	SGM group	0.43	0.35	0.22
	T/E group	0.53	0.28	0.06
	Serologic status (reference: strong positive serologic test result)			
	Positive serologic test result	-0.34	0.28	0.23
	Negative serologic test result	-0.96	0.33	0.004
LnPtot	Age	0.002	0.01	0.83
	Clinical subgroup (reference: MSM)			
	VSM group	0.5	0.4	0.23
	UM group	-1.7	0.32	<0.001
	Exposed patient group (reference: FGM)			
	SGM group	-0.3	0.45	0.52
	T/E group	0.3	0.4	0.48
	Serologic status (reference: strong positive serologic test result)			
	Positive serologic test result	-0.7	0.39	0.08
	Negative serologic test result	-1.1	0.43	0.009
LnPcirc	Age	0.02	0.007	0.01
	Clinical subgroup (reference: MSM)			
	VSM group	-0.15	0.25	0.55
	UM group	-2.1	0.2	<0.001
	Exposed patient group (reference: FGM)			
	SGM group	-0.34	0.28	0.23
	T/E group	0.12	0.23	0.6
	Serologic status (reference: strong positive serologic test result)			
	Positive serologic test result	0.5	0.3	0.049
	Negative serologic test result	0.5	0.3	0.052
LnPseq	Age	-0.08	0.07	0.23
	Clinical subgroup (reference: MSM)			
	VSM group	6.5	2.5	0.01
	UM group	1.2	2.1	0.57
	Exposed patient group (reference: FGM)			
	SGM group	-0.4	2.9	0.9
	T/E group	1.9	2.4	0.4
	Serologic status (reference: strong positive serologic test result)			
	Positive serologic test result	-6.7	2.5	0.009
	Negative serologic test result	-7.8	2.8	0.005

*The linear regression was performed on 176 patients, and age, clinical subgroup (very severe malaria (VSM), mild severe malaria (MSM), uncomplicated malaria (UM)), exposed patient group (first generation of migrant (FGM), second generation of migrant (SGM), travelers/expatriate (T/E)) and serologic status (negative, positive, strongly positive serologic test result) were selected as potential factors after univariate analysis. MSM group, FGM group and strongly positive serologic test result were chosen as reference. All parasite burdens are log-transformed for statistical analysis. Significance was set to p value<0.05.

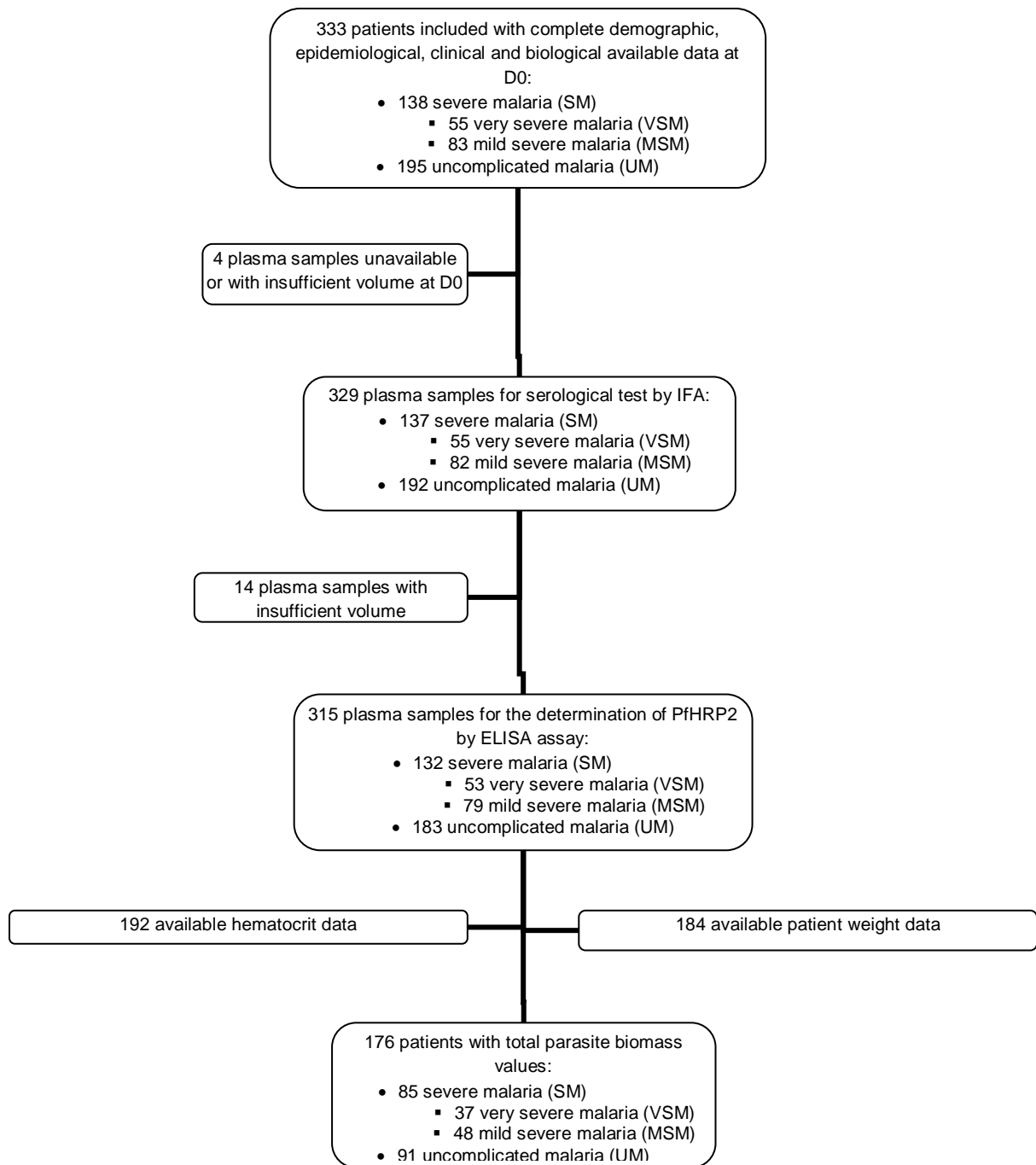


Figure 1: Flow chart representing the analysis process of included patient samples in the FNRCM laboratory of Bichat hospital from 2010 to 2013.

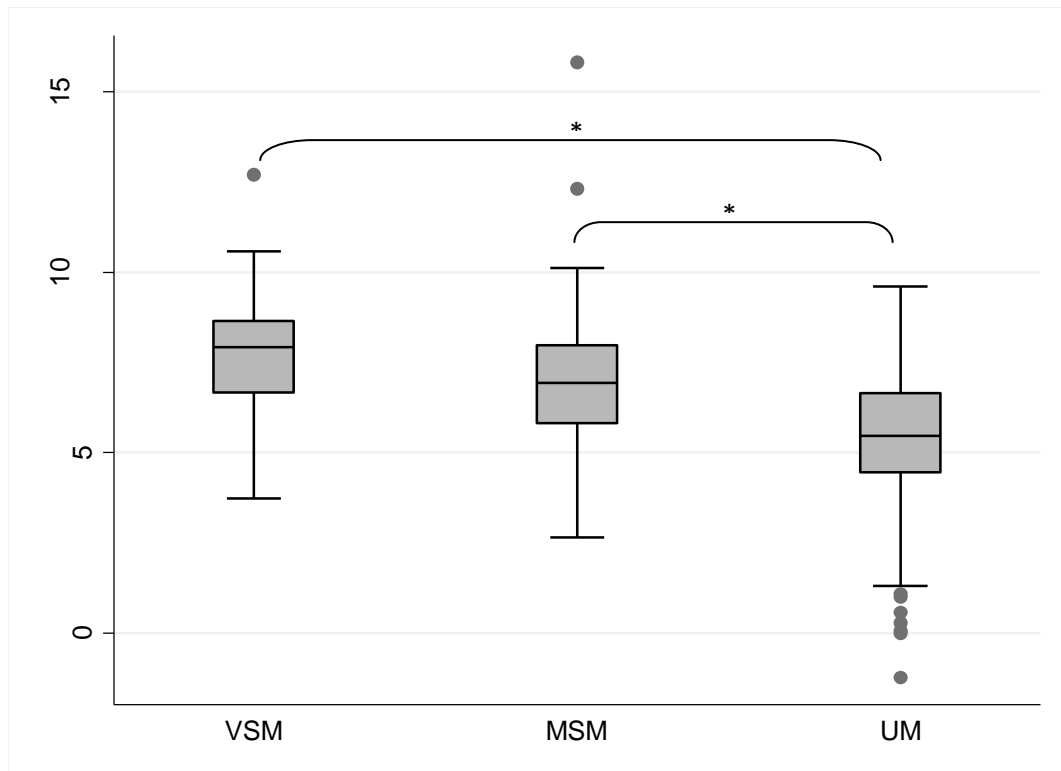


Figure 2: Log-transformed plasma levels of PfHRP2 (LnPfHRP2) for the VSM, MSM and UM group. Quantitative plasma level of PfHRP2 was determined on 315 D0 plasma samples by enzyme-linked immunosorbent assay. (*) corresponds to a significant difference with $p < 0.05$.

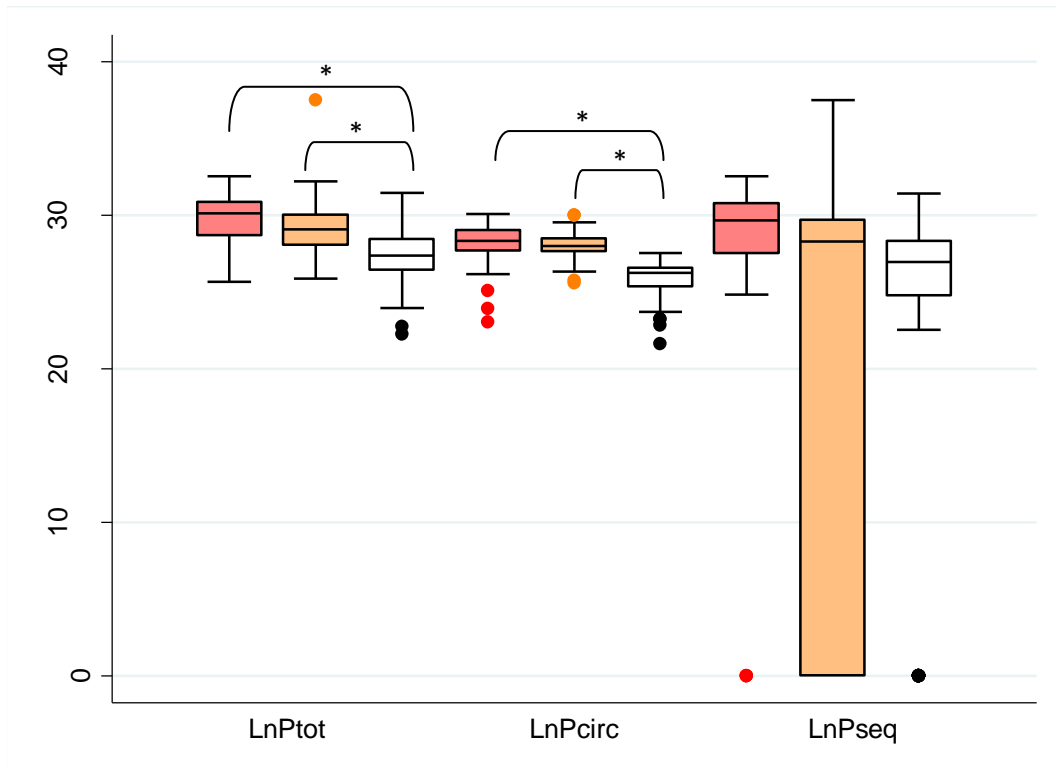


Figure 3: Representation of the log-transformed total parasite burden (LnPtot), circulating parasite burden (LnPcirc) and sequestered parasite burden (LnPseq) respectively in the VSM (red box plot), MSM (orange box plot) and UM group (white box plot). Parasite biomass was estimated for 176 patients using a mathematical approach as described (8) with quantitative plasma levels of PfHRP2 (g/l) determined by enzyme-linked immunosorbent assay, hematocrit (%), patient body weight (kg) and parasitemia (parasites/ μ l) on D0 sample. (*) corresponds to a significant difference with $p < 0.05$.

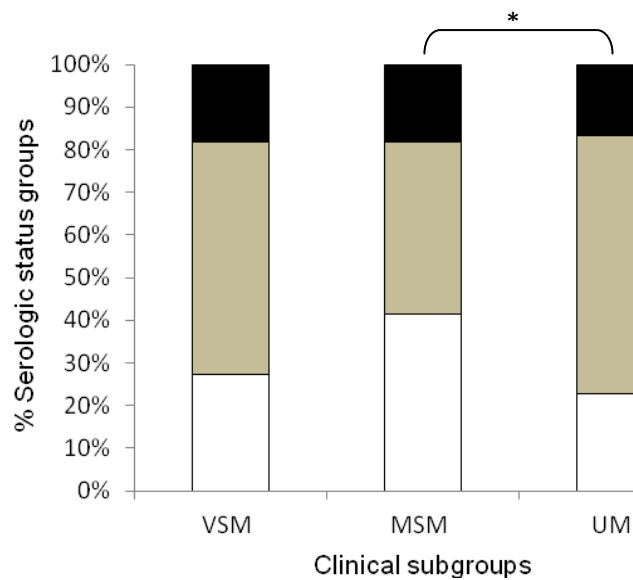


Figure 4: Proportion of serologic status groups in each clinical subgroup. As described previously, negative serologic test result (antibody titer equal to 0) (white box), positive serologic test result (antibody titer between 64 and 1,024) (gray box) and strong positive serologic test result (titer superior or equal to 4,096) (black box) determined by IFA are represented in percent (%) for each clinical subgroup, very severe malaria (VSM), mild severe malaria (MSM) and uncomplicated malaria (UM) as defined previously. (*) corresponds to a significant difference with $p < 0.05$.

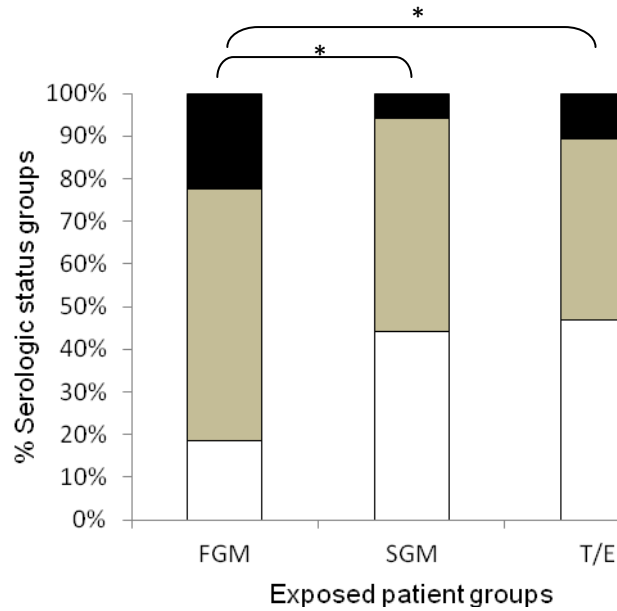


Figure 5: Proportion of serologic status groups in each exposed patient group. As described previously, negative serologic test result (antibody titer equal to 0) (white box), positive serologic test result (antibody titer between 64 and 1,024) (grey box) and strong positive serologic test result (titer superior or equal to 4,096) (black box) determined by IFA are represented in percent (%) for each exposed patient group, first-generation migrant (FGM), second-generation migrant (SGM) and travelers/expatriates (T/E) as defined previously. (*) corresponds to a significant difference with $p < 0.05$.

Chapitre 2

**Analyse de l'expression des gènes *var* et de domaines cassettes
dans le contexte du paludisme d'importation**

Les protéines PfEMP1 sont les facteurs parasitaires à l'origine de la séquestration des globules rouges parasités par *P. falciparum*, par leur interaction avec les récepteurs des cellules de l'hôte. Ces protéines sont composées d'une succession de domaines DBL et CIDR codées par une famille de gènes aux séquences hypervariables : les gènes *var*. Leur localisation chromosomique, leur sens de transcription et la nature de leur région promotrice ont néanmoins permis de les classer en groupes A, B, C, Var1, Var2csa, Var3 et en 2 groupes intermédiaires B/A et B/C.

La surexpression des gènes *var* des groupes A et B/A ainsi que de certaines régions codant pour des domaines cassettes (DC) de PfEMP1 a été décrite dans le neuropaludisme *in vivo* dans des populations d'enfants en zone d'endémie et confirmées *in vitro* à partir de souches de *Plasmodium falciparum*. DC8 et DC13 semblent être les motifs protéiques les plus impliqués dans le neuropaludisme mais DC4 et DC5, plus récemment décrits, semblent également participer à la survenue d'un accès palustre grave. L'étude de l'expression de ces gènes *var* présente néanmoins des résultats contradictoires en fonction de la population étudiée et la surexpression des gènes du groupe B a également été décrite dans l'accès palustre grave.

La majorité des données publiées a été obtenue à partir d'études faites sur des populations d'enfants résidant en zone d'endémie et présentant un tableau clinique de neuropaludisme, ce qui rend difficile la transposition de ces données aux patients présentant un paludisme d'importation, d'âge variable, avec différentes présentations cliniques. A notre connaissance, il n'existe aucune donnée publiée sur l'expression des gènes *var* et DC dans le contexte du paludisme d'importation.

L'objectif de cette étude était d'étudier le profil d'expression des gènes *var* et des domaines cassettes DC4, DC5, DC8 et DC13 puis d'analyser les résultats en fonction de critères

cliniques, épidémiologiques et biologiques afin de rechercher la surexpression de certains gènes associée au paludisme grave d'importation dans cette population hétérogène de patients.

La collecte des données épidémiologiques, cliniques et biologiques a été effectuée via le réseau de correspondants hospitaliers du CNR du paludisme; les patients étaient des migrants de première génération, des migrants de deuxième génération et des voyageurs/expatriés. L'étude de l'expression relative des gènes *var* et l'estimation des unités transcrites des DC ont été réalisées à l'aide de couples d'amorces spécifiques. Les niveaux d'expression des gènes ont été comparés selon la présentation clinique de l'accès palustre, l'origine ethnique des patients ou les statuts sérologiques. Une analyse factorielle de données mixtes et une clusterisation des patients ont été ensuite réalisées pour confirmer les résultats obtenus précédemment.

L'étude de l'expression des gènes *var* et des domaines cassettes DC4, DC5, DC8 et DC13 dans une population de 151 patients révélait une expression variable de ces gènes en fonction des groupes de patients étudiés. Alors que BC1 et Var1 étaient surexprimés dans les accès palustres simples, C1, Var2csa et CIDR α 1.6 étaient surexprimés dans les populations de migrants d'origine africaine. L'analyse factorielle avait permis de confirmer ces résultats et d'identifier les groupes de gènes *var* A, DC4, DC8 et DC13 comme impliqués dans la survenue d'un accès palustre grave d'importation.

Cette étude était la première à mettre en évidence la surexpression des gènes des groupes A et des domaines cassettes DC4, DC8 et DC13 dans le paludisme grave d'importation chez une population hétérogène de patients en termes d'âge, de présentation clinique, d'origine ethnique et de statut sérologique en provenance de différentes zones d'endémies palustres. La confirmation de la surexpression de ces gènes dans l'accès palustre grave est en faveur d'une

expression non aléatoire de ces gènes en fonction de facteurs d'hôtes et renforçait l'intérêt pour ces domaines cassettes dans l'objectif d'un potentiel candidat vaccin.

Les données issues de ce travail donneront lieu à un article qui est actuellement en cours de rédaction.

Analyse de l'expression des gènes var et de domaines cassettes dans le contexte du paludisme d'importation (Article en cours de rédaction)

Argy N^{1, 2, 3, 4}, Bertin GI^{3, 4}, Kendjo E², Hubert V², Maréchal C², Milet J⁴, Deloron P^{3, 4}, Houzé S^{1, 2, 3, 4}, and the FNRCM study group.

¹ Laboratoire de parasitologie, hôpital Bichat-Claude Bernard, APHP, Paris, France

² Centre national de référence du paludisme, hôpital Bichat-Claude Bernard, APHP, Paris, France

³ PRES Sorbonne Paris Cité, Faculté de pharmacie, Université Paris Descartes, Paris, France

⁴ Institut de recherche pour le développement, UMR216 MERIT, Paris, France

Introduction :

L'accès palustre à *Plasmodium falciparum* est une infection potentiellement mortelle en zone intertropicale notamment chez les enfants de moins de cinq ans. Responsable d'environ 600.000 morts en 2013 dont 90% en Afrique subsaharienne [1], *Plasmodium falciparum* représente également une menace pour les pays occidentaux d'Europe ou les Etats-Unis par l'importation de cas de paludisme facilitée par le développement des échanges commerciaux et du tourisme [2]. L'accès palustre à *P. falciparum* est fortement associé au risque de mortalité notamment chez le voyageur revenant de zone d'endémie [5]–[7], [25], [27]. Cette susceptibilité à l'infection palustre chez ces populations de voyageurs est la conséquence de la « naïveté » de leur système immunitaire vis-à-vis de *Plasmodium falciparum* [15], [153], [166], [174], [176], liée à l'absence d'une pré-exposition au parasite dès le plus jeune âge et souvent associée à l'origine ethnique du patient, de l'accumulation de facteurs de comorbidité dont ceux liés à l'âge des voyageurs et migrants [5]–[7], [23], [163], [199], et enfin du possible retard de prise en charge spécifique de ces patients par des praticiens peu habitués à traiter ce type d'infection d'origine tropicale [6], [7].

La séquestration des globules rouges parasités dans la microcirculation capillaire reste le principal mécanisme impliqué dans la survenue d'un accès palustre grave et résulte de l'interaction entre des récepteurs cellulaires de l'hôte et la protéine parasitaire *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP1) composée d'une succession de domaines protéiques DBL et CIDR, exprimée à la surface du globule rouge parasité [72], [75], [76], [85].

Une soixantaine de gènes, appartenant à la famille des gènes *var*, code pour ces protéines PfEMP1. L'hypervariabilité des séquences génomiques des gènes *var*, due aux recombinaisons géniques multiples, entraîne une variation de la séquence des protéines

PfEMP1 favorisant l'échappement du parasite à la réponse immunitaire de l'hôte infecté ainsi que des modifications dans le phénotype de cytoadhérence [67], [101], [102], [105], [106]. Les gènes *var* ont été classés selon leur localisation chromosomique, leur sens de transcription et la nature de leur promoteur en différents groupes : A, B, C, Var1, Var2csc et Var3 ainsi qu'en 2 groupes intermédiaires B/A et B/C [108]. Alors que l'expression des gènes du groupe B et C semble être associées à des accès « simples » et aux infections asymptomatiques en zone d'endémie [111]–[113], la surexpression des gènes du groupe A et B/A a été décrite dans l'accès palustre grave *in vivo* chez des populations d'enfants en zone d'endémie [96], [112], [113], [116], [117] et lors d'études *post mortem* dans différents tissus dont les tissus cérébraux [115], [200]. Ces résultats ont été également obtenus dans des études *in vitro* après sélection de souches de *Plasmodium falciparum* sur tissus endothéliaux cérébraux [114]. Néanmoins, certains résultats restent contradictoires et une surexpression des gènes du groupe B a également été observée dans l'accès palustre grave [112], [118], [200].

L'augmentation du nombre de transcrits des gènes *var* codant pour certains domaines protéiques conservés entre plusieurs séquences de PfEMP1 [77], appelés les domaines cassettes (DC), a également été identifiée *in vitro* à partir de souches de *Plasmodium falciparum* sélectionnées [78]–[81] et *in vivo* chez des populations d'enfants présentant un accès palustre grave [82], [83]. Parmi l'ensemble de ces domaines cassettes, DC8 et DC13 semblent être les motifs protéiques les plus directement impliqués dans la séquestration parasitaire associée au développement d'un tableau de neuropaludisme [80]–[83]. Cependant, d'autres DC tel que DC4 et DC5 ont par la suite été décrits comme également associés à des phénotypes de cytoadhérence impliqués dans les accès palustres graves [78], [79].

L'expression variable et parfois discordante de ces groupes de gènes *var* en fonction de la population étudiée, révèle une interaction complexe entre l'hôte et le parasite dont découle une physiopathologie particulière. Les gènes *var* et les domaines cassettes n'ont

principalement été étudiés que chez des enfants présentant un tableau clinique de neuropaludisme dans une zone d'endémie délimitée géographiquement ce qui peut correspondre à un répertoire restreint de clones de parasites circulants et ce qui rend difficile la transposition de ces données dans le paludisme d'importation. L'étude de la variation d'expression de ces gènes *var* et DC dans d'autres populations présentant différentes formes cliniques de paludisme permettrait de mieux comprendre la physiopathologie de l'accès grave versus l'accès simple. A notre connaissance, aucune étude d'expression des gènes *var* n'a été menée dans le cadre du paludisme d'importation chez des patients non résidents des zones d'endémie mais exposés au risque de développer un accès palustre grave, tels que les voyageurs et les migrants. A travers le CNR et son réseau de surveillance du paludisme d'importation en France métropolitaine, sur les prélèvements transmis dans ce contexte, nous avons étudié l'expression des gènes *var* et des régions codant certains motifs protéiques des domaines cassettes DC4, DC5, DC8 et DC13 de *Plasmodium falciparum*. L'analyse des résultats a été faite en tenant compte des critères cliniques, épidémiologiques et biologiques. L'objectif de la comparaison du niveau d'expression de ces gènes suivant ces facteurs d'hôte, influençant la présentation de la maladie, est de mettre en évidence des profils d'expression potentiellement impliqués dans l'accès palustre grave d'importation chez cette population hétérogène de patients.

Matériels et méthodes :

Echantillons inclus

Ces travaux ont été réalisés au laboratoire du CNR sur le site de l'hôpital Bichat-Claude Bernard entre 2011 et 2013 sur les prélèvements d'un sous groupe de patients issus de la cohorte de cas de paludisme d'importation préalablement décrite dans nos précédents travaux. Pour chaque patient, le recueil des données cliniques, épidémiologiques et biologiques a été

effectué, selon les mêmes modalités que celles précédemment mentionnées, par le réseau de correspondants du CNR via la base de données informatiques partagée et sécurisée. Pour cette étude, les critères d'inclusions des échantillons étaient : données épidémiologiques, cliniques et biologiques disponibles pour les patients ne résidant pas en zone d'endémie palustre excepté les expatriés, infection par *P. falciparum* seul à une parasitémie supérieure à 4500 parasites/ μ l confirmée au laboratoire du CNR sur le prélèvement de sang total ayant servi au diagnostic et disponible en quantité suffisante ainsi qu'une absence de prise d'une chimioprophylaxie efficace ou d'un traitement curatif dans les 30 derniers jours confirmée par un dosage plasmatique des principaux antipaludiques sur le prélèvement J0.

L'ensemble des techniques utilisées pour le diagnostic du paludisme au laboratoire du CNR ont été décrites dans les objectifs de mes travaux et dans l'étude précédente.

Prétraitement des échantillons

Après centrifugation, le plasma du J0 est congelé à -20°C jusqu'au dosage des antipaludiques et la réalisation de la sérologie anti-palustre. Le culot de globules rouges parasités est lavé 3 fois au RPMI, déleucocyté par aspiration du buffy coat à la propipette après le troisième lavage et mélangé avec du Trizol® Reagents (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA) à une proportion de 5 volumes de Trizol® par volume de culot globulaire parasité avant d'être congelé au -80°C .

Classifications des patients

Comme décrit précédemment, les patients ont été catégorisés en 3 groupes d'exposition tels que les migrants de première génération (MPG) (nés en zone d'endémie mais résidants en France), les migrants de deuxième génération (MSG) (nés en France de parents migrants et résidants en France) et les voyageurs/expatriés (nés en France et résidant en France ou en zone d'endémie (expatriés)). La classification clinique utilisée dans les travaux antérieurs a

également été conservée et comprend 3 groupes : les cas de paludisme « très grave » (PTG), les cas de paludisme « grave » (PG) et les cas d'accès palustre simple (APS).

Test sérologique par immunofluorescence indirecte (IFI)

La méthodologie est la même que précédemment citée : la détection des anticorps totaux anti-palustre et la détermination de leur titre sont réalisées par IFI sur antigènes figurés de schizontes d'une souche de 3D7 de *Plasmodium falciparum* à l'aide d'un conjugué anti-IgG/A/M humaine (Biorad®; Hercules, California, USA). Pour faciliter l'exploitation des résultats, les titres d'anticorps obtenus ont été classés en trois groupes : le titre 0 correspond à une sérologie négative, les titres 1 :64 ; 1 :256 et 1 :1024 à une sérologie positive et les titres \geq 1 :4096 à une sérologie fortement positive.

Extraction d'ARN et RT-PCR

L'extraction d'ARN est effectuée, selon les recommandations du fabricant, à partir du culot de globules rouges parasités mélangé avec du Trizol® Reagents (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA). 1 µg d'ARN extrait est par la suite traité par la DNase I, Amplification Grade® (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA) pour éliminer les risques de contamination par de l'ADN humain avant la réaction de RT réalisée avec le kit commercial Superscript® VILO™ (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA).

Expression des gènes *var* et des domaines cassettes

Pour étudier l'expression des groupes de gènes *var* dans notre population, 12 couples de primers (A1, A2, A3, B1, B2, C1, C2, BC1, BC2, var1, var2csa et var3) préalablement décrits par Rottmann et *al.*, [116] (Tableau 3) ont été choisis avec le gène séryl-tRNA synthétase (couple de primers p90) comme contrôle endogène. La réaction de RT-PCR est réalisée dans un mélange de 15µl, incluant 0.5 µl d'ADNc, 7.5 µl de Power SYBR® green PCR Master

Mix (Life Technologies ®, Carlsbad, California, USA) et 250 nM de primers, sur un appareil de PCR en temps réel ABl 7500 (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA). Les conditions d'amplification PCR se composent d'un cycle d'incubation de 10 minutes à 95°C suivi de 40 cycles d'amplification de 30 secondes à 95°C, 1 minute à 54°C et 30 secondes à 66°C. L'efficacité de l'amplification PCR (E), évaluée pour chaque couple de primers, est comprise entre 1.7 et 1.99. Pour les échantillons chez lesquels un Ct > 35, l'expression du gène est considéré comme nulle afin de rester dans les limites de linéarité déterminées lors de l'évaluation de l'efficacité des couples d'amorces. La spécificité de l'amplification PCR est évaluée par l'analyse des courbes de fusion des produits de PCR. Chaque échantillon d'ADNc est analysé en double pour chaque couple de primers à un seuil de mesure fixé à 0.1. L'expression relative (ER) de chaque groupe de gènes *var* ciblé par les 12 couples de primers et p90 est calculée selon la méthode de Pfaffl [137], [201] suivant la formule suivante :

$$ER = E_{\text{cible}}^{Ct_{\text{cible 3D7}} - Ct_{\text{cible éch}^*}} \cdot E_{\text{p90}}^{Ct_{\text{p90 éch}} - Ct_{\text{p90 3D7}}}$$

où la cible correspond aux différents transcripts de gènes *var*, p90 est considéré comme le gène de référence (gène de ménage) et l'ADN génomique de la souche de *Plasmodium falciparum* 3D7 constitue le calibrateur. Pour l'étude de l'expression des domaines cassettes, 11 couples de primers décrits par Lavstsen et *al.*, [82] ont été choisis, ciblant différentes régions d'ADNc codant pour des motifs protéiques de DC4, DC5, DC8 et DC13. L'ensemble des régions cibles de ces couples de primers est résumé dans le tableau 4. Le gène séryl-tRNA synthétase (couple de primers p90) est utilisé comme contrôle endogène. La réaction de RT-PCR est réalisée dans un mélange de 20 µl, incluant 2 µl d'ADNc, 10 µl de Power SYBR® green PCR Master Mix (Life Technologies ®, Carlsbad, California, USA) et 1 µM de primers, sur un appareil de PCR en temps réel ViiA™ (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA). Les conditions d'amplification PCR se composent d'un cycle d'incubation de 10 minutes à 95°C suivi de 45 cycles d'amplification de 30 secondes à 95°C, 1 minute à

60°C et 30 secondes à 66°C. La spécificité de l'amplification PCR est évaluée par l'analyse des courbes de fusion des produits PCR. Chaque échantillon d'ADNc est analysé à un seuil de mesure fixé à 0.1. L'abondance des transcrits pour chaque région cible est convertie en unité aléatoire de transcrits avec $\Delta Ct = Ct_{\text{gène DC}} - Ct_{p90}$ et $Tu = 2^{(5-\Delta Ct)}$ [82], [83]. Pour tous les transcrits de gènes *var* pour lesquels $\Delta Ct \geq 5$, une valeur de 5 leur est assigné correspondant à un Tu de 1 ce qui signifie que le niveau de transcrits du gène est inférieur à celui du contrôle p90.

Tableau 3 : Couples de primers utilisés pour l'étude de l'expression des gènes *var* et leurs régions cibles correspondantes.

Couples de primers	Séquence des primers	Régions cibles
A1	F : TTG-GGR-AAT-BTG-TTA-GTT-AYR-GCA-A R: CTG-CAA-AAC-TKC-GWG-CAA-C	DBL1 α du groupe A
A2	F : AAC-CCA-TCT-GTR-RAT-GAT-ATA-CCT-ATG-GA R: GTT-CCA-ASG-ATC-CAT-TRG-ATG-TAT-TA	Exon 2 du groupe A
A3	F : AGG-TAA-TGT-TTT-AGA-TGA-TGG-TAT R : ACC-AGA-ATA-TAC-ATT-ATT-TGA-TAC-ATA	Exon 2 du groupe A
B1	F : CAT-CCG-CCA-TGC-AAG-TAT-AA R: CGT-GCA-CGA-TTT-CGA-TTT-TT	UPS B
B2	F : ATC-AAG-GTA-ATT-TCA-TAC-ATA-TGT-GAT-A R:GTC-CGT-GCA-CGA-TTT-CGA-TTT-T	UPS B
C1	F : CAC-ATC-GAT-TAC-ATT-TTA-GCG-TTT R: TGT-GGT-AAT-ATC-ATG-TAA-TGG	UPS C
C2	F : GTA-GCG-ACA-ACC-ACG-RYA-TCA-TGG R : CAT-TGT-TAA-CAT-AGT-CTA-CCA-TTA	UPS C
BC1	F : GAC-AAA-ACT-TTC-ACC-CAA-TAG-A R: AAT-GAT-CGG-TGT-AAC-CAC-TAT-C	Exon 2 des groupes B et C
BC2	F : CAT-CTG-TTG-CAA-ATT-TAT-TCC-AAA-TAC R: TCA-GTA-GTA-TCA-GAC-ATA-AAT-GCA-TA	Exon 2 des groupes B et C
Var 1	F : TGG-CAC-ATC-TTT-GGT-ATA-AAA R: AAA-CCT-TTA-TAT-TCC-TGT-AAA-ATT-CA	Région UTR 5' de Var 1
Var 2	F : CAC-GAC-ATT-AAC-AAT-ACA-TGC-AGA R: CAT-TGC-ATT-CAC-AGA-CAT-TGG	Région UTR 5' de Var 2
Var 3	F : CGT-AAA-ACA-TGG-TGG-GAT-GA R: GGC-CCA-TTC-AGT-TAA-CCA-TC	Région codante de Var 3

Tableau 4 : Couples de primers utilisés pour amplifier les régions codantes les domaines protéiques correspondants aux domaines cassettes DC4, DC5, DC8 et DC13.

Domaines protéiques	Séquence des primers	Domaine cassette
DBLα2/1.1/2/4/7	F : TCC-TAC-CAA-TTT-AGA-TTA-CGT-CCC-TCA R: CGT-ACA-ATC-ATA-TCC-ATT-AAG-ACT-AC	
DBLγ4/6	F : AGA-AAC-AHA-TTT-TGC-KTG-G R: CCA-TGT-TCW-TTC-CAC-CAG-TCD-TCA-AG	DC8
DBLβ12 et DBLβ3/5	F : CAT-CAA-GTK-TGG-AGA-GCT-ATG-AAA-TGT-G R: TAA-TCT-TCT-ATK-GGG-ATA-CCA-TTA-CA	DC8
CIDRα1.1	F : TAA-RGT-GGG-AAC-ATC-AAC-TTA-AGA-AT R: CTA-AAT-CTT-YCG-TAA-ATT-GAT-CCC-AT	DC8
DBLα1.7	F : GAT-TAY-GTC-CCT-CAA-TTT-TTA-MGW-TGG-T R: GTT-TAC-GAA-ATG-CTT-CTC-GTT-GZT-TRC-C	DC13
CIDRα1.4	F : ACC-AAT-GGA-AAT-GCT-ATT-AYR-A R: TCG-KTT-TCC-CAC-TTT-ATA-STG-TC	DC13
DBLα1.4	F : GGT-TTC-ATA-CTA-ATG-TAT-GGC-ATC-GTA-A R : GMA-CGA-CTA-AAA-AGA-CAA-GGA-TTT-CT	DC4
DBLβ3	F : TGT-RAA-ACA-AAT-MGC-ACA-ATA-TTA-TAA-A R: GCA-TCR-SCY-TTC-AAA-GCW-CTT-CT	DC4
CIDRα1.6	F : AGA-AGG-CGC-AAT-AAA-AGT-GTT-GT R : GAA-TTA-TTG-TCT-ATG-CAT-CTT-TCA-GC	DC4
DBLβ7/9	F : AWG-ATT-GGT-GGG-AAG-CWA-AYM-GWG R : CAA-GAG-GGG-TAA-CAG-TGG-TAG-TAT-C	DC5
DBLγ DC5	F : GAT-TAT-GAK-GGR-TGT-GAA-AA R: KYG-TCG-TAG-GTT-TTA-TGA-GG	DC5

Analyses statistiques

Les patients inclus de manière prospective dans cette étude ont été sélectionnés, à partir d'une précédente cohorte bien définie, selon la présentation clinique de leur accès palustre en respectant une proportion de 2 accès palustres simples pour un accès palustre grave afin d'optimiser la puissance des analyses statistiques ultérieures.

Les variables quantitatives sont présentées sous forme de moyenne \pm déviation standard si les variables sont normalement distribuées et sous forme de médiane [25th percentile-75th percentile] pour les variables non normalement distribuées. Les variables qualitatives catégorielles sont présentées sous forme de nombre et de fréquence (%). Les niveaux d'expression des groupes de gènes *var* et des domaines cassettes ont été transformés en $\log(10)$ afin de normaliser leurs valeurs pour les analyses statistiques. Pour les gènes dont le niveau d'expression est indétectable pour certains isolats, une valeur deux fois inférieure à la valeur minimale de ce gène obtenue dans les autres isolats leur a été attribuée [202].

Les tests de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer la relation entre des variables quantitatives continues et des groupes, χ^2 et le test de Fisher's exact pour comparer des variables catégorielles entre les groupes. Pour chaque test, les différences étaient considérées comme significatives si $p \text{ value} < 0.05$. La correction de Bonferroni a été réalisée pour les comparaisons multiples entre données quantitatives et les groupes de patients. L'ensemble des tests statistiques a été effectué sur le logiciel STATA, version 12 (Stata corp®, College station, Texas, USA).

Analyse factorielle

Pour préciser de potentielles influences de facteurs d'hôte sur l'expression des gènes *var* et de certains domaines cassettes dans un contexte global prenant en compte l'ensemble des facteurs, les patients étudiés ont été regroupés en classes d'individus ayant des caractéristiques similaires.

Le regroupement de notre population en groupes d'études par clusterisation suivant les données cliniques, épidémiologiques et biologiques des patients a été effectué en 2 étapes.

Tout d'abord une analyse factorielle de données mixtes a permis une représentation intermédiaire des résultats en regroupant et en projetant les individus dans un repère factoriel élaboré suivant des axes factoriels explicatifs déterminés à partir des données quantitatives telles que l'âge des patients et les niveaux d'expression des gènes *var* et DC et des données qualitatives telles l'origine ethnique des patients et le statut sérologique. Cette analyse a été complétée par une classification hiérarchique ascendante qui a permis, à partir des facteurs représentatifs de l'analyse factorielle de données mixtes, de représenter les groupes de patients sous forme de dendrogramme et ainsi d'identifier et définir les clusters de patients. La présentation clinique a été considérée comme la variable illustrative de la typologie des données alors que les autres variables ont été considérées comme actives. La hiérarchisation des variables lors de la caractérisation en univariée des clusters a été réalisée suivant les valeurs du test value. L'ensemble des analyses factorielles et de clusterisation ont été réalisées à partir du logiciel TANAGRA, version 1.4.

Résultats :

Caractéristiques de la population étudiée

Entre 2011 et 2013, l'étude du profil d'expression des gènes *var* et des domaines cassettes a été menée sur une population de 151 patients parmi ceux initialement inclus dans la cohorte de paludisme d'importation précédemment décrite et étudiée (article soumis). Ce groupe était constitué de 95 hommes (62.9 %) et l'âge moyen était de 38.4 +/-16.1 ans. Cent patients étaient des migrants de première génération (MPG) (66.2 %), 22 étaient des migrants de seconde génération (MSG) (14.6 %) et 29 patients des voyageurs et expatriés (V/E) (19.2 %). Les accès palustres ont été classés en 93 accès palustre simple (APS) (61.6 %) et en 58 accès palustres graves (APG) (38.4 %) dont 18 cas d'accès palustres « très graves » (PTG) (31 %) et 40 accès palustres « graves » (PG) (69%). Le statut sérologique vis-à-vis du paludisme a pu être déterminé pour 147 patients sur le plasma à J0 (4 sérums manquants dans la population). Quarante-cinq patients étaient séronégatifs (30.6%) alors que 78 patients avaient une sérologie positive (1:64 < titre < 1:1024) (53%) et 24 patients une sérologie fortement positive (titre > 1:4096) (16.3%). La très grande majorité des patients revenaient d'un séjour en Afrique subsaharienne (96.7 %) et plus particulièrement d'Afrique de l'Ouest (66.2 %) puis d'Afrique centrale (29.2 %) et d'Afrique de l'Est (1.3%).

L'ensemble des données épidémiologiques, cliniques et biologiques de chaque catégorie clinique est détaillé dans le tableau 5. Cliniquement, les cas de paludisme « très graves » étaient caractérisés par la présence isolée d'une atteinte neurologique (56%), d'un état de choc (39%), d'une hyperlactatémie (44%) ou d'une insuffisance rénale (28%) accompagné d'une hyperparasitémie (61%) ou d'une association d'un ou plusieurs de ces signes. Les cas de paludisme « graves » présentaient majoritairement des signes d'ictère (23%) et d'hyperparasitémie (73%). L'âge moyen des patients était significativement différent entre les

groupes cliniques ($p = 0.02$) avec un âge plus élevé chez les patients présentant un accès palustre « très grave » par rapport aux patients présentant un accès palustre « grave » ($p = 0.017$). Les MPG étaient majoritaires en nombre dans tous les groupes cliniques mais il n'avait pas été mis en évidence de différences de répartition des groupes de patients exposés dans les groupes cliniques ($p = 0.61$) même si on observait que les MPG semblaient présenter plus fréquemment un APS (63% des cas) contrairement aux voyageurs/expatriés qui faisaient plus de formes « graves » et « très graves » (47% des cas). La répartition des MSG en fonction de la catégorie clinique était quasi similaire à celle des MPG avec 68.2 % d'APS dans ce groupe de patients. Le nombre de plaquettes différait également entre les groupes cliniques ($p = 0.02$) avec une thrombopénie plus prononcée chez les patients présentant un paludisme « très grave » par rapport aux patients avec un accès palustre simple ($p = 0.016$). La parasitémie suivait la même tendance que les plaquettes entre les groupes cliniques ($p = 0.007$) avec une charge parasitaire significativement plus importante lors d'un accès palustre « très grave » par rapport à un accès simple ($p = 0.001$). Le nombre d'antécédents palustre rapporté était à la limite de la significativité entre les groupes cliniques ($p = 0.05$). Les statuts sérologiques n'étaient pas significativement différents entre les présentations cliniques ($p = 0.32$). Néanmoins, il avait été observé que la proportion de sérologies négatives dans le groupe de PG (41%) semblait être plus importante que dans les autres groupes cliniques (16.6 % et 28.8 % respectivement pour PTG et APS). La proportion des différents titres sérologiques tendait à différer légèrement entre le groupe de PTG et d'APS avec plus de sérologies négatives chez les APS (28.8 % vs 16.6 %) et plus de sérologies très forte dans le PTG (27.8 % vs 15.6 %).

Les groupes de patients exposés présentaient certaines caractéristiques qui sont présentées dans le tableau 6. L'âge moyen était significativement différent entre les groupes de patients exposés ($p < 0.001$). Les MSG représentaient la population la plus jeune ($p < 0.001$ entre

MSG et MPG ou V/E) avec le nombre de plaquettes le plus élevé ($p < 0.001$). La parasitémie était également très différente entre les groupes de patients exposés ($p = 0.003$) et les voyageurs/expatriés étaient le groupe de patients avec la charge parasitaire la plus élevée ($p = 0.03$). Les statuts sérologiques différaient significativement entre les groupes d'exposition ($p = 0.03$) avec une proportion de sérologies négatives plus importante chez les MSG et V/E par rapport aux MPG (44.8 %, 45.4 % et 22.9 % respectivement). A l'inverse, la proportion de sérologies positives et fortement positives était plus importante chez les MPG (55.2 % et 21.9 % respectivement) ($p = 0.03$).

Tableau 5 : Données épidémiologiques, cliniques et biologiques des patients inclus dans l'étude du profil d'expression des gènes *var* et des domaines cassettes dans le cadre du paludisme d'importation.

		APG (n=58)		APS (n=93)	P value	Total (n=151)
		PTG (n=18)	PG (n=40)			
Epidémiologie	Age (année)*	46.6± 18.3	34±15	38.7±15.7	0.02	38.4±16.1
	Homme**	9 (50)	23 (57.5)	63 (67.7)	0.25	95 (62.9)
	MPG**	13 (72.2)	24 (60)	63 (67.7)		100 (66.2)
	MSG**	1 (5.6)	6 (15)	15 (16.1)	0.61	22 (14.6)
	V/E**	4 (22.2)	10 (25)	15 (16.1)		29 (19.2)
	Afrique de l'ouest**	11 (61)	23 (58)	66 (71)		100 (66.2)
	Afrique Centrale**	6 (33)	14 (35)	24 (26)	NA	44 (29.2)
	Afrique de l'Est**	0 (0)	1 (3)	1 (1)		2 (1.3)
	Océan indien**	1 (6)	2 (5)	2 (2)		5 (3.3)
Clinique	Antécédents de paludisme déclarés**	2 (20)	6 (17.7)	27 (40.3)	0.05	35 (31.5)
	Immunodépression connue**	1 (5.6)	5 (12.5)	4 (4.3)	0.22	10 (6.6)
	Apparition des symptômes (jours)***	4 [0-9]	1 [0-6]	3 [0-8]	0.07	2 [0-8]
	Prise en charge (jours)***	4 [3-7]	4 [2-7]	3 [2-5]	0.34	3 [2-6]
	Troubles neurologiques**	10 (56)	0 (0)	0 (0)		
	Choc**	7 (39)	0 (0)	0 (0)		
	Détresse respiratoire**	1 (6)	0 (0)	0 (0)	NA	NA
	Syndrôme hémorragique**	0 (0)	1 (3)	0 (0)		
	Hémoglobinurie**	0 (0)	5 (13)	0 (0)		
	Ictère clinique**	3 (17)	9 (23)	0 (0)		
Biologie	Plaquettes (G/l)***	39.5 [32-69]	61 [40-120]	89 [60-127]	0.02	76.5 [47-119.5]
	Parasitémie (parasite/μl)***	225000 [63000-427500]	270000 [158750-438750]	54000 [31500-84150]	0.0007	78750 [45000-207000]
	Acidose (pH<7.35)**	3 (17)	0 (0)	0 (0)		
	Hyperlactatémie (>2.2 mmol/l)**	8 (44)	0 (0)	0 (0)		
	Hyperparasitémie (>180000 parasite/μl)**	11 (61)	29 (73)	0 (0)		
	Anémie (Hb<8g/dl)**	1 (6)	2 (5)	0 (0)	NA	NA
	Créatinine (>265μmol/l)**	5 (28)	0 (0)	0 (0)		
	Hypoglycémie (<2.2mmol/l)**	1 (6)	0 (0)	0 (0)		
	Hyperbilirubinémie (>50μmol/l)**	3 (17)	9 (23)	0 (0)		
	Critères de gravité***	2 [1-5]	1 [1-1]	0 [0-0]		
Sérologie palustre	Fortement positif	5 (27.8)	5 (12.8)	14 (15.6)		24 (16.3)
	Positif	10 (55.6)	18 (46.2)	50 (55.6)	0.32	78 (53)
	Négatif	3 (16.6)	16 (41)	26 (28.8)		45 (30.6)

*Les variables normalement distribuées sont représentées par leur moyenne ± leur déviation standard.

**Les variables catégorielles qualitatives sont représentées par leur valeur absolue et leur fréquence (%).

***Les variables non normalement distribuées sont représentées par leur médiane [25th percentile-75th percentile].

La variable apparition des symptômes correspond à la période entre le retour de zone d'endémie et le début des symptômes. La prise en charge correspond au délai en jours entre l'apparition des symptômes et la consultation dans une structure médicalisée dans laquelle a été réalisé le diagnostic et le suivi du patient.

L'immunodépression dans notre population inclut l'infection par le VIH et toute immunodépression iatrogène.

Tableau 6 : Données épidémiologiques et biologiques des patients exposés inclus dans l'étude du profil d'expression des gènes *var* et des domaines cassettes dans le cadre du paludisme d'importation.

	MPG (n = 100)	MSG (n = 22)	V/E (n = 29)	P value	Total (n = 151)
Age (année)*	40.5±14.1	19.8±11.2	45.1±16.3	< 0.001	38.4±16.1
Antécédents **	25 (36.8)	3 (15.8)	7 (29.2)	0.24	35 (31.5)
Plaquettes (G/l)***	75.5 [49-120]	112 [92-211]	55 [29-84.5]	< 0.001	76.5 [47-119.5]
Parasitémie (parasites/μl)***	70200 [45000-187875]	90000 [40500-112500]	113440 [54000-405000]	0.003	78750 [45000-207000]
Sérologie fortement positive*	21 (21.9)	1 (4.6)	2 (6.9)		24 (16.3)
Sérologie positive*	53 (55.2)	11 (50)	14 (48.3)	0.03	78 (53)
Sérologie négative*	22 (22.9)	10 (45.4)	13 (44.8)		45 (30.6)

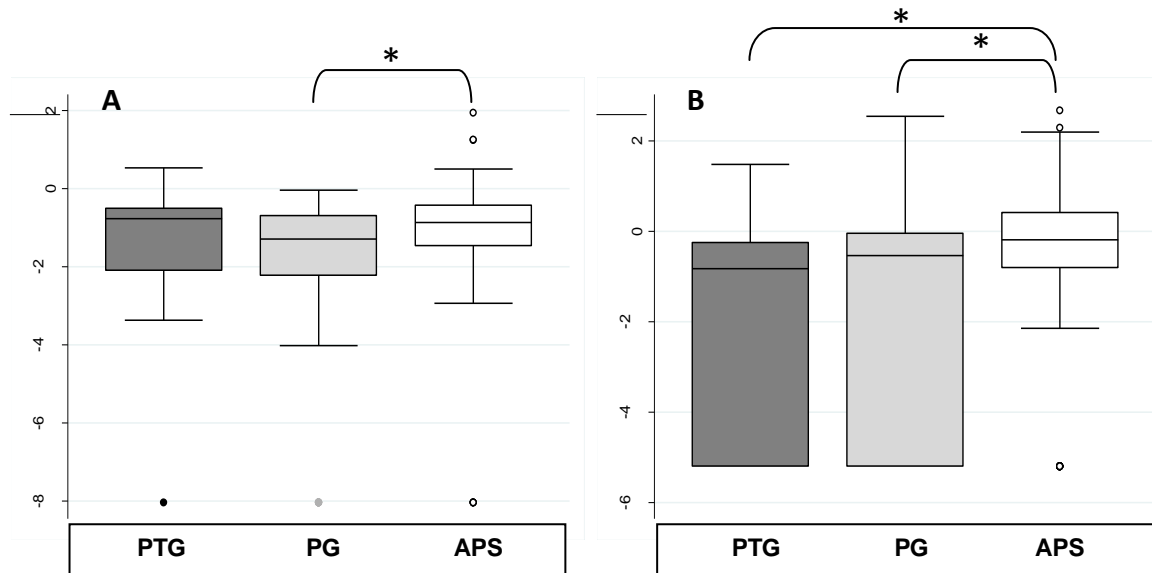
*Les variables normalement distribuées sont représentées par leur moyenne ± leur déviation standard.

**Les variables catégorielles qualitatives sont représentées par leur valeur absolue et leur fréquence (%).

***Les variables non normalement distribuées sont représentées par leur médiane [25th percentile-75th percentile].

Relation entre l'expression des gènes *var* et des DC et la présentation clinique

La comparaison des niveaux d'expression des groupes de gènes *var* selon la présentation clinique permettait de mettre en évidence une différence d'expression significative de BC1 ($p = 0.03$) et Var1 ($p = 0.008$). BC1 était surexprimé dans les APS ($p = 0.008$ entre APS et PG) et montrait une tendance à la surexpression dans le PTG (figure 15a) alors que Var1 était exclusivement surexprimé dans les APS ($p = 0.009$ entre PTG vs. APS ; $p = 0.03$ entre PG et APS) (figure 15b). En appliquant la même méthodologie pour les DC, aucune différence n'avait pu être mise en évidence entre l'expression des DC et la présentation clinique.

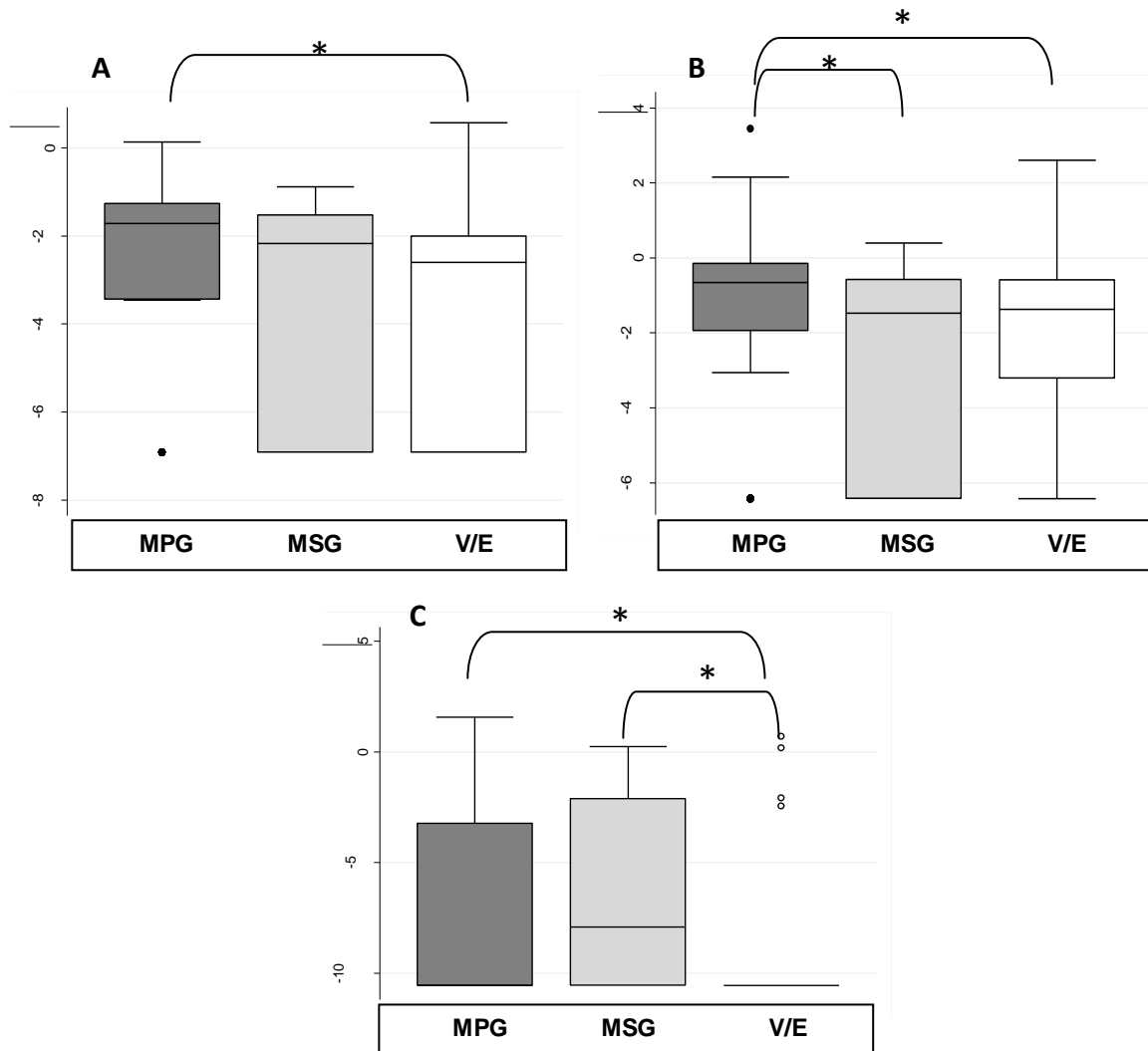


La catégorie clinique des patients a été divisée en cas de paludisme « très grave » (boite noir), paludisme « grave » (boite grise) et paludisme simple (boite blanche). * signifie une p-value < 0.05. Le niveau d'expression des gènes est transformé en log(10) pour la représentation graphique.

Figure 15 : Niveau d'expression des groupes de gènes *var* BC1 (A) et Var1 (B) en fonction de la catégorie clinique des patients.

Relation entre l'expression des gènes *var* et des DC avec les facteurs d'hôte

Les niveaux d'expression des gènes ont été comparés entre les groupes de patients exposés mettant en évidence une influence significative de l'origine ethnique sur le profil d'expression de la famille de gènes C1 ($p = 0.01$), Var2 ($p = 0.02$) et CIDR α 1.6 ($p = 0.03$). C1 était préférentiellement exprimé chez les MPG ($p = 0.005$ entre MPG et V/E) et tendait à être non significativement augmenté chez les MSG (figure 16a). Var2 était surexprimé chez les MPG ($p = 0.02$ pour MPG vs. MSG ; $p = 0.04$ pour MPG vs. V/E) (figure 16b) tandis que CIDR α 1.6 était surexprimé chez tous les patients migrants de notre cohorte ($p = 0.02$ pour MPG vs. V/E ; $p = 0.01$ pour MSG vs. V/E) (figure 16c).



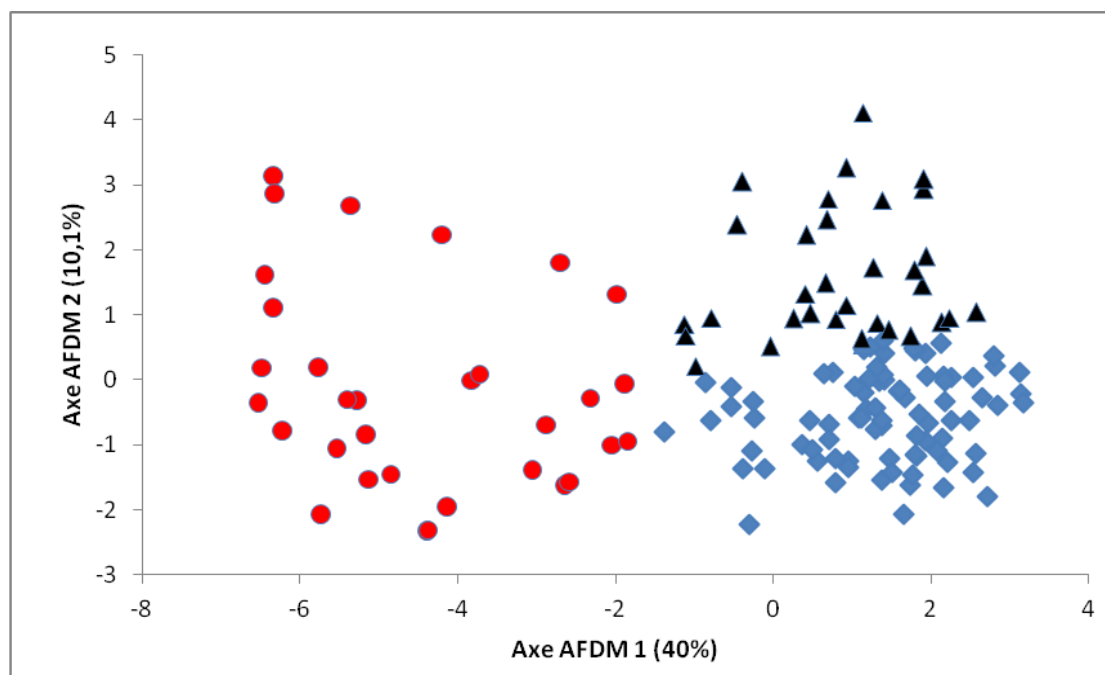
Niveau d'expression des gènes *var* (expression relative) et des DC (unité transcrit Tu) chez les migrants de 1ère génération (MPG) (boite noire), migrants de 2nd génération (MSG) (boite grise) et les voyageurs/expatriés (V/E) (boite blanche). * signifie une p-value < 0.05. Les niveaux d'expression des gènes sont transformés en $\log(10)$ pour la représentation graphique.

Figure 16 : Niveau d'expression des groupes de gènes *var* C1 (A), *Var2* (B) et *CIDRα1.6* (C) en fonction du groupe d'exposition des patients.

La comparaison entre les différents groupes de statut sérologique (sérologie fortement positive, positive et négative) ne révélait aucune différence significative d'expression des gènes *var* et DC entre ces groupes même si on observait une tendance vers l'augmentation de l'expression d'A3 chez les patients séronégatifs ($p = 0.06$) ainsi qu'une augmentation de l'expression de *CIDRα1.4* ($p = 0.06$) et *CIDRα1.6* ($p = 0.06$) pour les patients dont la sérologie était fortement positive.

Clusterisation de la population

L'analyse factorielle de données mixtes, réalisée dans un premier temps pour l'expression des gènes *var*, a permis d'identifier pour 147 patients (4 patients avec données manquantes), 2 principaux axes factoriels expliquant respectivement 40 % et 10.1% des données de la population. Le regroupement des patients en fonction de ces axes factoriels explicatifs pour le niveau d'expression des groupes de gènes *var* avait produit 3 groupes ou clusters respectivement de 32, 34 et 81 patients qui peuvent être visualisés sur le scatterplot de la figure 17. Le cluster 1 (rond rouge) représentait une population bien distincte des 2 autres clusters 2 (triangle noir) et clusters 3 (losange bleu) qui étaient plus proches, présentant probablement des traits de similarités.



Représentation en scatterplot des patients présents dans le cluster 1 (rond rouge), le cluster 2 (triangle noir) et le cluster 3 (losange bleu) suivant les axes 1 (40% des valeurs expliquées) et 2 (10.1% des valeurs expliquées). Ces axes explicatifs ont été déterminés à partir des variables âge, groupes d'exposition (MPG, MSG et V/E), statut sérologique (négatif, positif et fortement positif) et niveaux d'expression des groupes de gènes *var*.

Figure 17 : Scatterplot des clusters de patients suivant les axes factoriels explicatifs obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, statut sérologique et des niveaux d'expression des groupes de gènes *var*.

Les caractéristiques avec l'importance de chaque variable quantitative et catégorielle sont représentées pour chaque cluster dans le tableau 7.

L'ensemble des informations contenu dans le tableau 7 nous permettait de faire ressortir les indications suivantes dans ces 3 clusters :

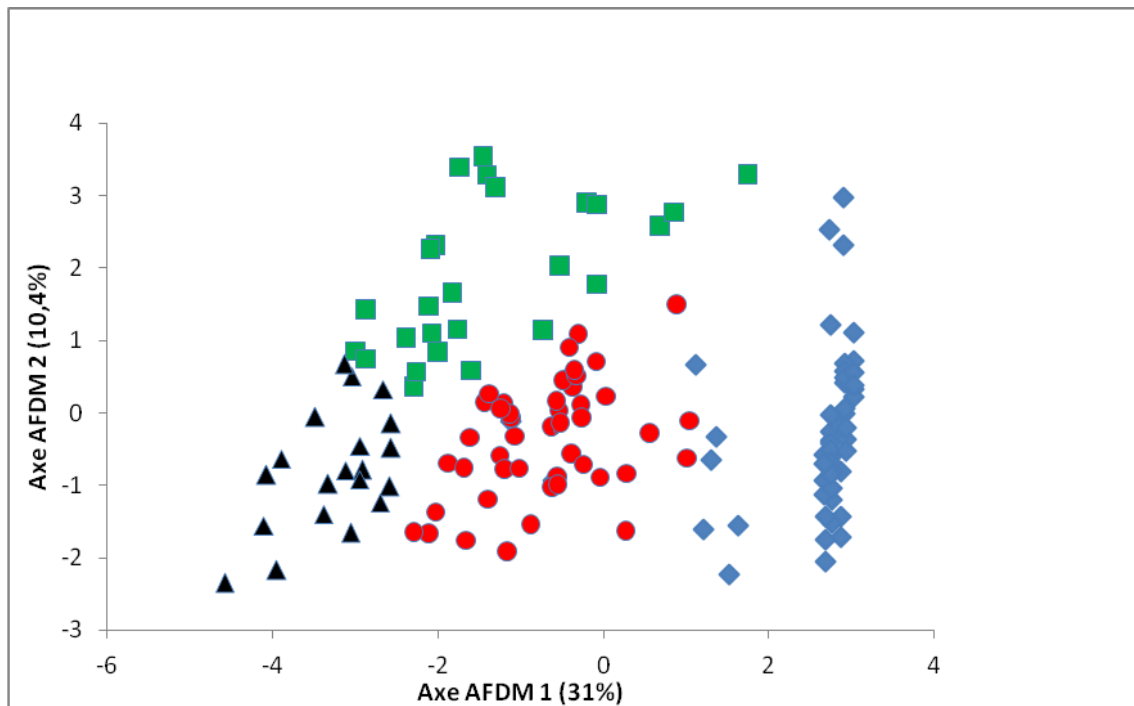
- Le cluster 1 était composé par une proportion importante de patients présentant un paludisme grave par rapport à la population générale et dont la moyenne d'âge était plus élevée. Aucun groupe d'exposition ni statut sérologie ne ressortait dans ce cluster. La proportion de patients présentant un APS était significativement diminuée dans ce cluster. Le niveau d'expression des gènes *var* était significativement diminué pour l'ensemble des gènes *var* étudié même si on observait une expression plus élevée de Var2 et B2 contrairement à C2, C1 et B1 (test value = -10.01).
- Le cluster 2 était composé de patients jeunes MSG avec une sérologie négative. La proportion de MPG, de patients avec une sérologie positive ou fortement positive et de patients présentant un PTG était significativement diminuée dans ce cluster par rapport à la population générale. Le niveau d'expression des gènes B1, A3, C2, A2, A1, Var1 était significativement augmenté dans ce groupe tandis que Var2 était sous exprimé.
- Le cluster 3 était composé en majorité par des patients plus âgés que dans la population générale qui étaient des MPG avec une sérologie positive et fortement positive. La proportion de MSG et de patients séronégatifs était significativement diminuée dans ce cluster. L'ensemble des gènes *var* était surexprimé dans ce cluster mais C1, BC2, BC1 et Var1 semblaient être les plus surexprimés alors qu'A2, A1 et A3 sont les moins surexprimés dans ce cluster.

Description des clusters var											
Cluster 1				Cluster 2				Cluster 3			
Effectif [%]		32 [21.8 %]		Effectif [%]		34 [23.1 %]		Effectif [%]		81 [55.1%]	
Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population
Variables continues : moyenne (déviation standard)				Variables continues : moyenne (déviation standard)				Variables continues : moyenne (déviation standard)			
Age	1,46	41,9 (18,9)	38,24 (16,24)	B1	3,2	-1,50 (0,84)	-2,98 (3,06)	C1	6,17	-2,01 (1,70)	-3,16 (2,51)
Var2	-4,72	-3,85 (2,67)	-1,96 (2,55)	A3	2,82	-1,33 (1,95)	-2,41 (2,53)	BC2	5,77	-1,51 (2,12)	-2,96 (3,37)
B2	-5,96	-4,64 (3,62)	-2,21 (2,61)	C2	2,81	-1,89 (1,28)	-2,99 (2,60)	BC1	5,66	-0,60 (0,71)	-1,47 (2,06)
BC1	-7,26	-3,81 (3,02)	-1,47 (2,06)	A2	2,66	-0,95 (0,66)	-1,95 (2,49)	Var1	5,64	-0,17 (1,23)	-1,11 (2,23)
Var3	-7,3	-6,42 (2,29)	-3,13 (2,87)	A1	2,12	-1,38 (1,59)	-2,29 (2,83)	Var2	5,59	-0,90 (1,82)	-1,96 (2,55)
A3	-7,83	-5,52 (0,92)	-2,41 (2,53)	Var1	2,01	-0,43 (1,42)	-1,11 (2,23)	B1	5,59	-1,70 (2,05)	-2,98 (3,06)
A1	-8,15	-5,91 (3,68)	-2,29 (2,83)	C1	1,62	-2,55 (1,97)	-3,16 (2,51)	C2	5,47	-1,93 (1,85)	-2,99 (2,60)
BC2	-8,5	-7,46 (3,09)	-2,96 (3,37)	BC2	1,52	-2,19 (2,25)	-2,96 (3,37)	B2	5,14	-1,21 (1,33)	-2,21 (2,61)
A2	-8,73	-5,37 (3,44)	-1,95 (2,49)	Var3	1,21	-2,60 (2,40)	-3,13 (2,87)	Var3	5,04	-2,04 (2,24)	-3,13 (2,87)
Var1	-8,85	-4,21 (2,17)	-1,11 (2,23)	BC1	0,43	-1,34 (1,31)	-1,47 (2,06)	A2	4,99	-1,02 (0,78)	-1,95 (2,49)
C1	-9,1	-6,75 (0,96)	-3,16 (2,51)	B2	-0,23	-2,30 (2,29)	-2,21 (2,61)	A1	4,96	-1,23 (1,28)	-2,29 (2,83)
C2	-9,46	-6,85 (1,27)	-2,99 (2,60)	Var2	-1,97	-2,72 (2,66)	-1,96 (2,55)	A3	4,11	-1,63 (2,20)	-2,41 (2,53)
B1	-10,01	-7,79 (1,42)	-2,98 (3,06)	Age	-4,96	26,1 (13,6)	38,24 (16,24)	Age	2,99	41,9 (13,6)	38,2 (16,24)
Variables catégorielles: [% variable dans le groupe] %				Variables catégorielles: [% variable dans le groupe] %				Variables catégorielles: [% variable dans le groupe] %			
PG	2,49	[35,9 %] 43,8 %	26,50%	MSG	6,51	[77,3 %] 50,0 %	15,00%	MPG	4,55	[68,8 %] 81,5 %	65,30%
V/E	0,84	[27,6 %] 25,0 %	19,70%	Sérologie négative	4,9	[48,9 %] 64,7 %	30,60%	Sérologie positive	2,32	[64,1 %] 61,7 %	53,10%
PTG	0,66	[27,8 %] 15,6 %	12,20%	APS	1,67	[27,8 %] 73,5 %	61,20%	Sérologie fortement positive	1,69	[70,8 %] 21,0 %	16,30%
Sérologie fortement positive	0,42	[25,0 %] 18,8 %	16,30%	V/E	-0,35	[20,7 %] 17,6 %	19,70%	PTG	1,05	[66,7 %] 14,8 %	12,20%
MSG	0,12	[22,7 %] 15,6 %	15,00%	PG	-0,45	[20,5 %] 23,5 %	26,50%	APS	0,82	[57,8 %] 64,2 %	61,20%
Sérologie positive	0,01	[21,8 %] 53,1 %	53,10%	PTG	-1,88	[5,6 %] 2,9 %	12,20%	V/E	-0,41	[51,7 %] 18,5 %	19,70%
Sérologie négative	-0,34	[20,0 %] 28,1 %	30,60%	Sérologie fortement positive	-2,4	[4,2 %] 2,9 %	16,30%	PG	-1,68	[43,6 %] 21,0 %	26,50%
MPG	-0,79	[19,8 %] 59,4 %	65,30%	Sérologie positive	-2,75	[14,1 %] 32,4 %	53,10%	Sérologie négative	-3,87	[31,1 %] 17,3 %	30,60%
APS	-2,69	[14,4 %] 40,6 %	61,20%	MPG	-4,59	[11,5 %] 32,4 %	65,30%	MSG	-5,62	[0,0 %] 0,0 %	15,00%

Tableau représentant les clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupes d'exposition (MPG, MSG et V/E), statut sérologique (négatif, positif et fortement positif) et niveaux d'expression des groupes de gènes *var*. L'ordre de représentation des différentes variables quantitatives et qualitatives est fonction de la valeur du test-value dans chaque cluster. Les variables significativement différentes dans chaque cluster par rapport à la population générale sont représentées en gras sur fond orange. Les valeurs du niveau d'expression des gènes ont été transformées en $\log(10)$.

Tableau 7 : Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, statut sérologique et des niveaux d'expression des groupes de gènes *var*.

Le regroupement des patients a également été effectué, selon la même méthodologie, pour le niveau d'expression des régions codant pour les motifs protéiques de DC4, DC5, DC8 et DC13. L'analyse factorielle des données mixtes a permis d'identifier pour 147 patients, 2 principaux axes factoriels expliquant respectivement 31 % et 10.4 % des données de la population. Le regroupement des patients en fonction de ces axes factoriels explicatifs pour le niveau d'expression des DC avait produit 4 groupes ou clusters respectivement de 52, 24, 46 et 25 patients qui peuvent être visualisés sur le scatterplot de la figure 18. Le cluster 1 (losange bleu), le cluster 2 (triangle noir), le cluster 3 (rond rouge) et le cluster 4 (carré vert) étaient relativement regroupés au centre du scatterplot (figure 18) avec une proximité existante entre certains points.



Représentation en scatterplot des patients présents dans le cluster 1 (losange bleu), le cluster 2 (triangle noir), le cluster 3 (rond rouge) et le cluster 4 (carré vert) suivant les axes 1 (31% des valeurs expliquées) et 2 (10.4% des valeurs expliquées). Ces axes explicatifs ont été déterminés à partir des variables âge, groupes d'exposition (MPG, MSG et V/E), statut sérologique (négatif, positif et fortement positif) et niveaux d'expression des DC.

Figure 18 : Scatterplot des clusters de patients suivant les axes factoriels explicatifs obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, statut sérologique et des niveaux d'expression des DC.

Les caractéristiques avec l'importance de chaque variable quantitative et catégorielle sont représentées pour chaque cluster dans le tableau 8.

Description des clusters DC															
Cluster 1				Cluster 2				Cluster 3				Cluster 4			
Effectif [%] 52 [34.5 %]				Effectif [%] 24 [16.3 %]				Effectif [%] 46 [31.3 %]				Effectif [%] 25 [17 %]			
Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population
Variables continues: moyenne (déviation standard)				Variables continues: moyenne (déviation standard)				Variables continues: moyenne (déviation standard)				Variables continues: moyenne (déviation standard)			
Age	0,93	39,92 (15,69)	38,24 (16,24)	CIDRα1,4	5,74	-6,45 (3,24)	-8,18 (1,61)	DBLβ3	3,51	-1,82 (2,44)	-3,18 (3,15)	DBLα2	4,05	-0,32 (2,34)	-3,76 (4,63)
DBLγDC5	-2,26	-8,24 (0,00)	-7,95 (1,17)	CIDRα1,6	5,70	-2,93 (3,55)	-7,41 (4,20)	DBLα2	3,10	-1,99 (3,49)	-3,76 (4,63)	DBLβ12	3,99	0,10 (1,67)	-2,16 (3,09)
CIDRα1,4	-2,33	-8,60 (0,00)	-8,18 (1,61)	DBLβ12	5,36	0,95 (0,94)	-2,16 (3,09)	DBLγ4/6	2,27	-4,05 (3,49)	-5,03 (3,52)	DBLα1,4	3,67	-4,05 (4,65)	-7,01 (4,41)
DBLα1,4	-5,94	-9,94 (2,00)	-7,01 (4,41)	DBLγDC5	5,30	-6,78 (2,33)	-7,95 (1,17)	DBLβ12	2,25	-1,30 (2,71)	-2,16 (3,09)	DBLα1,7	3,44	-1,85 (3,18)	-4,13 (3,61)
DBLβ7/9	-6,24	-11,05 (2,62)	-7,34 (5,32)	DBLβ7/9	5,28	-2,08 (3,91)	-7,34 (5,32)	DBLβ7/9	1,81	-6,16 (5,31)	-7,34 (5,32)	CIDRα1,1	3,20	-4,24 (5,20)	-7,29 (5,22)
CIDRα1,6	-6,32	-10,39 (1,11)	-7,41 (4,20)	DBLα2	5,06	0,64 (0,77)	-3,76 (4,63)	Age	1,77	41,76 (13,45)	38,24 (16,24)	DBLβ3	2,83	-1,55 (2,49)	-3,18 (3,15)
CIDRα1,1	-6,59	-11,14 (1,29)	-7,29 (5,22)	DBLγ4/6	4,92	-1,79 (1,90)	-5,03 (3,52)	DBLα1,7	1,67	-3,39 (3,42)	-4,13 (3,61)	CIDRα1,6	2,27	-5,67 (4,31)	-7,41 (4,20)
DBLγ4/6	-6,96	-7,77 (1,87)	-5,03 (3,52)	CIDRα1,1	4,86	-2,54 (4,70)	-7,29 (5,22)	DBLα1,4	0,63	-6,67 (4,45)	-7,01 (4,41)	DBLγ4/6	1,21	-4,25 (3,51)	-5,03 (3,52)
DBLα1,7	-7,88	-7,31 (1,06)	-4,13 (3,61)	DBLβ3	4,83	-0,33 (2,08)	-3,18 (3,15)	CIDRα1,1	0,32	-7,09 (5,15)	-7,29 (5,22)	DBLβ7/9	0,51	-6,85 (5,44)	-7,34 (5,32)
DBLβ3	-9,36	-6,47 (0,62)	-3,18 (3,15)	DBLα1,7	4,60	-1,01 (2,66)	-4,13 (3,61)	CIDRα1,6	0,14	-7,34 (4,12)	-7,41 (4,20)	CIDRα1,4	-0,05	-8,19 (1,42)	-8,18 (1,61)
DBLβ12	-9,46	-5,43 (0,76)	-2,16 (3,09)	DBLα1,4	3,17	-4,39 (4,12)	-7,01 (4,41)	DBLγDC5	-1,41	-8,15 (0,63)	-7,95 (1,17)	DBLγDC5	-0,61	-8,07 (0,83)	-7,95 (1,17)
DBLα2	-10,11	-9,00 (1,49)	-3,76 (4,63)	Age	2,58	46,08 (16,10)	38,24 (16,24)	CIDRα1,4	-2,13	-8,60 (0,00)	-8,18 (1,61)	Age	-5,90	20,72 (9,13)	38,24 (16,24)
Variables catégorielles : [répartition dans le groupe] %				Variables catégorielles : [répartition dans le groupe] %				Variables catégorielles : [répartition dans le groupe] %				Variables catégorielles : [répartition dans le groupe] %			
Sérologie négative	1,52	[44,4 %] 38,5 %	30,6 %	Sérologie fortement positive	3,66	[41,7 %] 41,7 %	16,3 %	Sérologie positive	1,63	[37,2 %] 63,0 %	53,1 %	MSG	7,52	[72,7 %] 64,0 %	15,0 %
V/E	1,18	[44,8 %] 25,0 %	19,7 %	MPG	2,49	[21,9 %] 87,5 %	65,3 %	MPG	1,47	[35,4 %] 73,9 %	65,3 %	PG	1,67	[25,6 %] 40,0 %	26,5 %
APS	0,76	[37,8 %] 65,4 %	61,2 %	PTG	0,72	[22,2 %] 16,7 %	12,2 %	V/E	0,86	[37,9 %] 23,9 %	19,7 %	Sérologie négative	1,59	[24,4 %] 44,0 %	30,6 %
MPG	0,01	[35,4 %] 65,4 %	65,3 %	APS	0,14	[16,7 %] 62,5 %	61,2 %	PTG	0,74	[38,9 %] 15,2 %	12,2 %	Sérologie positive	-0,12	[16,7 %] 52,0 %	53,1 %
PTG	-0,19	[33,3 %] 11,5 %	12,2 %	Sérologie positive	-0,33	[15,4 %] 50,0 %	53,1 %	PG	-0,08	[30,8 %] 26,1 %	26,5 %	APS	-0,59	[15,6 %] 56,0 %	61,2 %
Sérologie fortement positive	-0,23	[33,3 %] 15,4 %	16,3 %	PG	-0,69	[12,8 %] 20,8 %	26,5 %	APS	-0,42	[30,0 %] 58,7 %	61,2 %	PTG	-1,38	[5,6 %] 4,0 %	12,2 %
PG	-0,70	[30,8 %] 23,1 %	26,5 %	V/E	-0,97	[10,3 %] 12,5 %	19,7 %	Sérologie négative	-0,80	[26,7 %] 26,1 %	30,6 %	V/E	-1,61	[6,9 %] 8,0 %	19,7 %
Sérologie positive	-1,24	[30,8 %] 46,2 %	53,1 %	MSG	-2,24	[0,0 %] 0,0 %	15,0 %	Sérologie fortement positive	-1,20	[20,8 %] 10,9 %	16,3 %	Sérologie fortement positive	-1,82	[4,2 %] 4,0 %	16,3 %
MSG	-1,34	[22,7 %] 9,6 %	15,0 %	Sérologie négative	-2,58	[4,4 %] 8,3 %	30,6 %	MSG	-2,92	[4,5 %] 2,2 %	15,0 %	MPG	-4,29	[7,3 %] 28,0 %	65,3 %

Tableau représentant les clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupes d'exposition (MPG, MSG et V/E), statut sérologique (négatif, positif et fortement positif) et niveaux d'expression des DC. L'ordre de représentation des différentes variables quantitatives et qualitatives est fonction de la valeur du test-value dans chaque cluster. Les variables significativement différentes dans chaque cluster par rapport à la population générale sont représentées en gras sur fond orange. Les valeurs du niveau d'expression des gènes ont été transformées en $\log(10)$.

Tableau 8 : Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, statut sérologique et des niveaux d'expression des DC.

L'ensemble des données obtenues présentées dans le tableau 8 nous a permis de faire ressortir les spécificités de ces 4 clusters :

- Le cluster 1 était composé de patients légèrement plus âgés que la population générale, dans lequel aucune variable catégorielle n'était significativement différente du reste de la population. Le niveau d'expression dans ce groupe des DC étudiés était significativement diminué par rapport au reste de la population générale mais on observait néanmoins une expression plus importante de $DBL\gamma DC5$ et de $CIDR\alpha 1.4$ et une expression plus faible de $DBL\beta 3$, $DBL\beta 12-DBL\beta 3/5$ et de $DBL\alpha 2/1.1/2/4/7$.
- Le cluster 2 était essentiellement composé de patients MPG plus âgés que dans la population générale avec une sérologie fortement positive. Les MSG et les patients avec une sérologie négative étaient significativement moins importants. Dans ce cluster, tous les gènes des DC étaient significativement surexprimés par rapport à la population générale. $CIDR\alpha 1.4$ et $CIDR\alpha 1.6$ semblaient néanmoins surexprimés dans ce cluster contrairement à $CIDR\alpha 1.1$, $DBL\beta 3$, $DBL\alpha 1.4$ et $DBL\alpha 1.7$ qui étaient surexprimés.
- Le cluster 3 était constitué de patients MPG avec une sérologie positive. Les accès palustres « très grave » dans ce cluster représentaient 38.9% de l'ensemble des PTG de la population. L'expression des DC dans ce groupe était caractérisée par une

augmentation significative de l'expression de DBL β 3, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, DBL γ 4/6, DBL β 12-DBL β 3/5 et d'une diminution de l'expression de DBL γ DC5 et CIDR α 1.4.

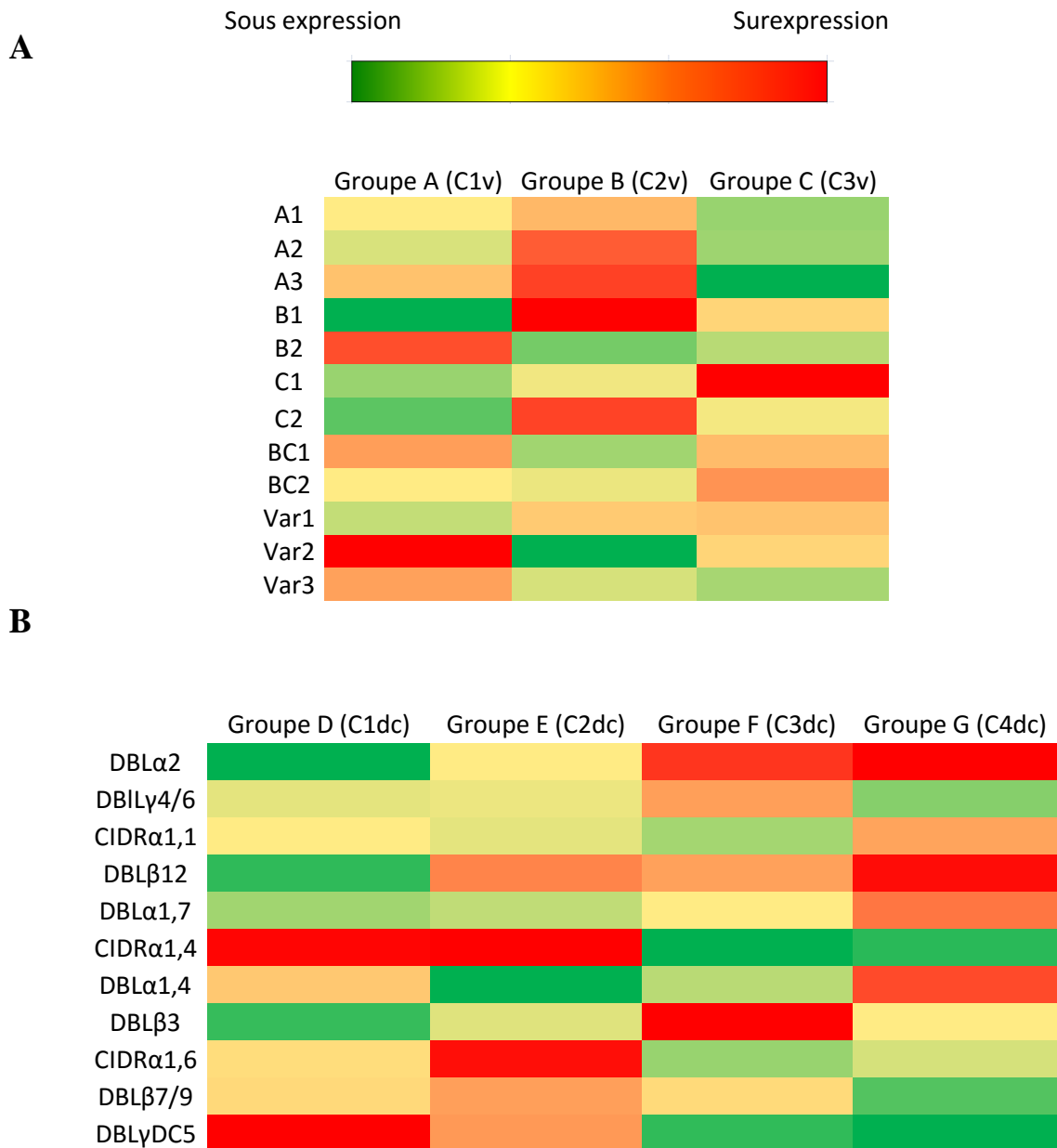
- Le dernier cluster 4 était composé majoritairement de patients MSG très jeunes séronégatifs qui présentaient un paludisme « grave » alors que les MPG et les patients avec une sérologie fortement positive étaient significativement moins importants dans ce groupe. L'expression des gènes DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL α 1.4, DBL α 1.7 et CIDR α 1.1 étaient significativement augmentée dans ce groupe.

L'ensemble de ces observations sur l'expression des gènes *var* et DC dans cette population sous l'influence de différents d'hôte a permis d'identifier des groupes de gènes pour lesquels l'expression était plus importante dans les groupes de patients à risque de PTG et PG (Figure 19). Les clusters formés par l'analyse précédente pouvaient être identifiés tel que :

1. Groupe A = Cluster 1 de l'analyse des gènes *var* (C1v): groupe de patients à risque de présenter un paludisme grave.
2. Groupe B = Cluster 2 de l'analyse *var* (C2v): groupe de patients hétérogènes avec une probabilité plus importante de présenter un APS mais avec un faible risque de PG.
3. Groupe C = Cluster 3 de l'analyse *var* (C3v): groupe de patients « protégé » plus susceptible de présenter un APS.
4. Groupe D = Cluster 1 de DC (C1dc): groupe de patients hétérogènes sans risque identifié.
5. Groupe E = Cluster 2 de DC (C2dc): groupe hétérogène à risque de présenter un APS ou un PTG.

6. Groupe F = Cluster 3 de DC (C3dc): Groupe hétérogène de patients à risque de présenter un PTG ou un APS.

7. Groupe G = Cluster 4 de DC (C4dc): Groupe de patients à risque de présenter un PG.



Pour chaque colonne d'un cluster, les niveaux d'expression des gènes sont estimés en fonction de la valeur du test-value obtenue lors de la comparaison des niveaux d'expression des gènes dans les clusters par rapport à ceux de la population générale. L'augmentation de la valeur de la test-value associée à une augmentation du niveau d'expression du gène est figurée par un code couleur d'intensité variable.

Figure 19 : Profil des niveaux d'expression des groupes de gènes *var* (A) et des DC (B) selon le groupe de cluster définis.

Cette classification en groupe d'individus a mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes A1, A2, A3, B1, B2, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, CIDR α 1.1, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL α 1.7, DBL γ 4/6, DBL α 1.4 et DBL β 3 dans le paludisme « très grave » et le paludisme « grave » d'importation correspondant aux gènes des groupes A, B et des DC8, DC13 et DC4.

Discussion :

Au cours de ce travail, nous avons étudié les profils d'expression des gènes *var* et des domaines cassettes codant pour PfEMP1 qui ont été montrés associés aux différentes formes cliniques de paludisme. Cependant, l'origine ethnique du patient infecté, son âge et son statut sérologique vis-à-vis du paludisme ont été retrouvés comme des facteurs d'hôte avec un fort impact sur la présentation clinique de l'infection palustre. Nous avons analysé les profils d'expression des gènes *var* et DC en fonction de la clinique, du groupe de patients exposés et de la sérologie anti-palustre dans l'objectif d'identifier un gène ou un groupe de gènes très fortement associés à l'accès palustre « grave » ou « très grave » de part sa surexpression dans les groupes cliniques correspondants ou dans un groupe de patients considérés comme à risque de développer un accès palustre « grave » ou « très grave ».

L'analyse factorielle prenant en compte les influences simultanées de l'âge, de l'origine ethnique, du statut sérologique et de la présentation clinique est assimilée à une étude multivariée et a permis, par clusterisation de nos données de transcriptomique, de confirmer la surexpression des gènes observée lors des analyses univariées et d'identifier d'autres gènes potentiellement incriminés dans le PG et PTG. L'étude du transcriptome des gènes *var* et des domaines cassettes, sur le prélèvement J0, dans notre population hétérogène de patients rencontrés dans le cadre de paludisme d'importation, a mis en évidence une augmentation du niveau d'expression de A1, A2, A3, B1, B2, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, CIDR α 1.1, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL α 1.7, DBL γ 4/6, DBL α 1.4 et DBL β 3 dans le paludisme « grave » et le

paludisme « très grave » d'importation. Ces gènes et groupes de gènes correspondent aux groupes des gènes *var* A, B et aux DC8 (DBL α 2, CIDR α 1.1, DBL β 12, DBL γ 4/6), DC13 (DBL α 1.7) et DC4 (DBL α 1.4 et DBL β 3/5).

Nous retrouvons les résultats de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* qui avaient déjà décrit qu'un groupe restreint de gènes *var* du groupe A et B/A était préférentiellement exprimé au cours de l'atteinte neurologique lors de l'accès palustre grave [96], [112], [113], [115]–[117], [200] correspondant à la surexpression de certains domaines cassettes tels que DC4, DC5 et surtout DC8 et DC13, DC fortement impliqués dans le neuropaludisme [78]–[83], [91]. Ces observations sont également en accord avec les données de transcriptomique à plus large échelle obtenues en zone d'endémie [203] où un groupe restreint de gènes *var* du groupe A, les groupes B, DC8 et DC13 ont été impliqués dans le paludisme grave et plus précisément dans le neuropaludisme chez les enfants en zone d'endémie [79], [82], [83], [112], [113], [116], [118]. DC4 est un domaine cassette qui a été décrit au départ à partir de souches de *Plasmodium falciparum* pour lesquelles une cytoadhérence sur ICAM-1 avait été mise en évidence, phénotype associé au neuropaludisme. Aucune étude n'a été menée en zone d'endémie pour confirmer la présence de DC4 chez des isolats de patients même si la présence d'anticorps dirigés contre des motifs protéiques de DC4 a été révélée chez des enfants confirmant un contact entre l'hôte et cette protéine en zone d'endémie [78].

Ce travail est le premier à mettre en évidence ces gènes A, B, DC4, DC8 et DC13 dans une population, différente de celle des enfants de moins de cinq ans en zone d'endémie, à risque de paludisme grave présentant des facteurs d'hôte particuliers tel que l'âge, la différence d'origine ethnique et une pré-exposition au parasite variable. Ces gènes sont donc surexprimés dans cette population du paludisme d'importation en provenance de très nombreuses régions d'Afrique subsaharienne confirmant l'implication de ces gènes dans le paludisme grave à l'échelle des régions hyperendémiques d'Afrique subsaharienne. La

systematisation de ces résultats dans différentes régions d'Afrique et chez des patients aux caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques différentes pose de nombreuses questions. L'expression de ces groupes de gènes *var* et DC déjà décrits dans le paludisme grave, chez des groupes hétérogènes de patients en provenance de zones de forte transmission d'Afrique subsaharienne est probablement en faveur de la conservation d'un répertoire antigénique très restreint conférant au parasite un avantage de cytoadhérence ou de multiplication chez l'hôte, responsable de la survenue d'un accès grave. Cette hypothèse est en faveur d'une expression hiérarchisée non randomisée des gènes *var* chez les populations à risque avant le développement d'une immunité protectrice et qui peut être influencée par la suite sous l'effet de certains facteurs d'hôte.

Dans le cadre du paludisme d'importation, il a été montré l'influence de l'âge, de l'origine ethnique et de la pré-exposition sur la présentation clinique mais d'autres facteurs tel que le polymorphisme génétique de l'hôte a été étudié et démontre une influence significative de ces facteurs d'hôte sur les formes cliniques de la maladie pouvant conditionner l'expression des gènes *var* lors de l'infection palustre [89], [204]. Ce polymorphisme n'a pas été étudié dans notre population mais des études ultérieures seraient nécessaires afin de les identifier et de les évaluer. Néanmoins, l'identification de facteurs d'hôte et de leur effet sur la transcription des gènes *var* reste délicate par l'existence de nombreuses interrelations entre l'âge, l'exposition, le polymorphisme génétique, l'origine ethnique et l'immunité.

L'expression des gènes des groupes B et C était associée aux formes simples et asymptomatiques en zone d'endémie [111], [113], [117]. Par cette approche, une augmentation du niveau d'expression de BC1 et Var1 a été mise en évidence de manière significative dans les APS. Les primers utilisés pour l'amplification de BC1 ciblent la région conservée de l'exon 2 des gènes B et C [116], groupes de gènes *var* déjà associés aux formes simples et asymptomatiques en Papouasie-Nouvelle-Guinée [111], [113], ce qui confirme

l'implication de ces gènes dans les formes simples de la maladie. *Var1* ou *DC1*, est un gène *var* considéré comme un pseudo gène « atypique » du fait d'une transcription continue au cours du cycle parasitaire [109], [205]. Il code pour une structure protéique conservée de *PfEMP1* [77] qui ne génère qu'une très faible production d'anticorps chez les patients exposés ce qui fait suspecter une faible exposition de cette protéine *Var1* à la surface du globule rouge parasité ou une faible immunogénicité de cette protéine [169]. L'ensemble de ces caractéristiques et observations pourrait être en faveur d'une surexpression de *Var1* dans l'APS ou d'une coexpression de ce gène lors de l'infection palustre non compliquée.

La comparaison de l'expression des *var* et *DC* en fonction du groupe de patients exposés a également permis de décrire une surexpression des gènes *C1* et *Var2* chez les migrants de première génération et de *CIDR α 1.6* chez les migrants de première et deuxième génération. Au vue des caractéristiques de la population de MPG et de MSG, ces gènes sont donc plus fréquemment surexprimés dans les APS dans le cadre du paludisme d'importation. Ces observations confirment les données antérieures pour le gène *C1* dont l'expression a été retrouvée dans les formes simples et asymptomatiques de la maladie [111], [113] tandis que *Var2* a été décrit initialement comme le gène codant pour la protéine *PfEMP1* impliquée dans le paludisme gestationnel [123], [124]. La surexpression de *Var2* est uniquement retrouvée de manière significative chez les MPG, ce qui peut s'expliquer par un contact préalable des MPG avec des antigènes issus de l'expression d'autres gènes *var*, permettant le développement d'un répertoire anticorps, qui restreint la production de certaines protéines par le parasite et favorise l'expression de ce gène *Var2*. Une expression plus fréquente de ce gène liée au paludisme gestationnel chez nos populations de MPG dans le cadre du paludisme d'importation est également envisageable. En effet, la présence déclarée de très rares femmes enceintes (2 femmes enceintes) et potentiellement de femmes multigestes dans notre population peut expliquer ce profil d'expression chez les MPG. La surexpression de

CIDR α 1.6 chez les MPG et MSG, qui peut être associée dans ces groupes à la survenue d'un accès palustre simple, n'est pas concordant avec ce qui avait été décrit auparavant. CIDR α 1.6 a été retrouvé surexprimé chez les enfants présentant un neuropaludisme et compose le domaine cassette DC4, DC impliqué dans la fixation à ICAM-1 via la région DBL β 3, qui serait corrélé à l'atteinte neurologique chez les patients à risque. [78], [82]. Cependant, malgré ces données, le rôle du motif CIDR α 1.6 n'est pas clairement défini dans l'accès palustre et aucun ligand n'a pour le moment été identifié pour ce domaine protéique. CIDR α 1.6 n'est pas un ligand d'EPCR incriminé dans le paludisme grave [91] même si les données récentes semblent contradictoires [206] et ne possède pas la structure caractéristique des ligands de CD36, retrouvé majoritairement dans les APS [75], [86]. Par conséquent, le ligand potentiel de CIDR α 1.6 reste à être confirmé et permettrait de mieux caractériser le rôle de CIDR α 1.6 dans l'accès palustre.

La comparaison de l'expression des gènes en fonction du statut sérologique n'a pas permis d'identifier une relation significative avec le niveau d'expression des gènes. Ces résultats confirment la difficile interprétation des résultats de sérologie anti-palustre qui ne reflètent pas toujours l'exposition antérieure au parasite et donne une image quantitative à la réponse anticorps plutôt qu'une image qualitative, reflet d'une réponse humorale vis-à-vis du parasite. L'expression des gènes *var* ne semble donc pas varier en fonction du statut sérologique de l'hôte.

Les patients dont nous avons inclus les échantillons dans cette étude sur l'expression des gènes *var* et DC présente les mêmes caractéristiques que les patients de notre étude précédente dans laquelle nous avons montré que l'âge élevé, l'origine ethnique et la pré-exposition à *Plasmodium falciparum* avaient été identifiés comme des facteurs influents. On retrouve les mêmes tendances pour les facteurs de risque initiaux avec chez les PTG un âge plus élevé pour les V/E et les MPG, chez les APG une proportion plus importante de V/E et

une proportion d'APS plus importante chez les MPG et MSG. Avec un âge plus élevé, une thrombopénie plus sévère et une proportion plus importante d'APG, les V/E sont un groupe à risque de développer un PG voire un PTG contrairement aux MPG qui constitue un groupe moins susceptible aux formes graves. Le statut sérologique, comme précédemment observé dans une étude antérieure et comme précédemment décrit dans nos travaux [207], ne constitue en aucun cas un marqueur d'une « immunité protectrice » au vu du peu de différences existant entre les profils sérologiques observés chez les patients avec un PTG ou un APS mais il reste néanmoins un bon reflet de la pré-exposition au parasite lorsqu'on compare les statuts sérologiques entre les différents groupes de patients exposés. Les titres sérologiques sont en effet plus élevés chez les MPG que dans les autres groupes, probable cicatrice sérologique d'une exposition antérieure et possible reflet d'une immunité protectrice [178]. La population de cette étude semble être des patients qui présentent un paludisme représentatif du paludisme d'importation avec toutes les réserves déjà citées précédemment, où l'on retrouve les facteurs de risque de l'accès palustre « très grave » décrits auparavant.

La discordance des résultats de certaines études en fonction de la population étudiée [112], [113], [118] démontre que l'expression des gènes *var*, outre son rôle dans la présentation clinique de la maladie, résulte d'une complexe interaction entre le parasite et des facteurs d'hôte.

Si l'hypothèse d'une expression hiérarchisée des gènes *var* et DC chez les patients à risque de développer les formes graves de la maladie est envisageable, le potentiel des protéines PfEMP1 codées par ces gènes comme éventuels candidats vaccins est de nouveau suggéré par les résultats présentés mais de nombreuses études sont encore à effectuer afin de mieux caractériser l'expression de ces gènes dans un contexte clinique spécifique d'organes telles que l'insuffisance rénale aiguë, l'atteinte hépatique et l'atteinte neurologique isolée, et de

contrôler la variabilité des protéines PfEMP1 présentes à la surface des globules rouges parasités en fonction des régions et des tableaux cliniques.

Cette étude, du fait de la taille, de l'hétérogénéité de la population étudiée et du non appariement des patients limitant la puissance de l'étude, ne nous permet de présenter qu'une tendance dans l'expression des gènes responsables des tableaux cliniques observés et a donc davantage un objectif de screening de l'expression des gènes dans ce contexte. Nous ne pouvons affirmer à ce stade l'implication plus précise de ces groupes de gènes dans la survenue d'un accès « grave » ou d'un accès « très grave » mais une tendance est entrevue. La surexpression de chaque groupe de gènes mise en évidence devra être confirmée dans des études plus précises de type étude de cohorte ou étude cas-témoins dans le cadre du paludisme d'importation. De plus, les limites de matériels biologiques nous a obligés à faire des choix pour l'étude de l'expression des gènes *var* et des DC. D'autres DC et motifs protéiques associés, ne pouvant être testés dans cette étude par manque de matériels biologiques, peuvent également être impliqués et des études complémentaires seront nécessaires pour valider ces hypothèses.

Chapitre 3

**Etude du phénotype de cytoadhérence des isolats de *P. falciparum*
dans le cadre du paludisme d'importation.**

La surexpression de groupes restreints de gènes *var* A et B/A, codant pour des protéines semi conservées de PfEMP1 et contenant certains domaines cassettes, a été mise en évidence dans le tableau de neuropaludisme au cours de l'accès palustre grave. Le principal mécanisme physiopathologique impliqué dans cette atteinte repose sur la séquestration des globules rouges parasités par un phénomène de cytoadhérence aux récepteurs des cellules endothéliales de l'hôte ou par le phénomène de *rosetting* défini par la fixation d'un globule rouge parasité à des globules rouges non parasités.

Une quinzaine de récepteurs d'hôte a déjà été décrite comme intervenant lors de la cytoadhérence mais seulement trois récepteurs : CD36, ICAM-1 et plus récemment EPCR ont été plus particulièrement impliqués dans la survenue d'un accès palustre grave. Ces résultats de cytoadhérence étaient néanmoins contradictoires selon les études, liées probablement à la variation de certains de ces récepteurs. L'importance du phénomène de *rosetting* a été également démontrée.

La grande majorité des données de cytoadhérence disponibles est issue d'études *in vitro* et de quelques études *in vivo* menées chez des enfants présentant un accès palustre grave dont la transposition aux autres patients n'a pas été étudiée. A notre connaissance, il n'existe aucune donnée de cytoadhérence, ni de *rosetting* à partir d'isolats collectés chez des patients présentant un accès palustre grave dans un contexte de paludisme d'importation.

L'objectif de cette étude était d'évaluer *in vitro* les phénotypes de cytoadhérence d'isolats de *P. falciparum* sur trois récepteurs (CD36, ICAM-1 et EPCR) ainsi que le phénomène de *rosetting*. Les résultats ont été analysés en fonction de différents critères d'hôtes dans le but d'essayer d'établir une corrélation entre le phénotype de cytoadhérence observé et le profil d'expression des gènes *var* et domaines cassettes obtenu pour les mêmes échantillons.

Pour chaque isolat inclus dans cette étude, la collecte des données épidémiologiques, cliniques et biologiques du patient hôte a été effectuée via le réseau de correspondants hospitaliers du CNR du paludisme. Les patients étaient des patients résidents en zone d'endémie, des migrants de première génération, des migrants de deuxième génération et des voyageurs/expatriés. Après maturation des formes parasitaires des isolats cliniques en culture de moins de 48 heures, la détermination du pourcentage de *rosetting* a été réalisée par l'examen microscopique de la suspension de formes parasitaires matures marquées à l'acridine orange et les phénotypes de cytoadhérence ont été déterminés par une méthode statique sur support solide mettant en œuvre des récepteurs solubles de CD36, ICAM-1 et EPCR. La fréquence de *rosetting* et la quantité de globules rouges adhérents sur chaque récepteur ont été ensuite comparées en fonction de la présentation clinique des accès palustres associés aux isolats et de la catégorie d'exposition des patients infectés. L'étude de l'expression relative des gènes *var* et l'estimation des unités transcrites des DC ont été réalisées, après extraction de l'ARN des mêmes formes parasitaires matures obtenues *in vitro*, à l'aide de couples d'amorces spécifiques ; les niveaux d'expression de ces gènes ont été comparés entre les groupes cliniques et ethniques différents. Une analyse factorielle de données mixtes a été réalisée par la suite pour confirmer les résultats obtenus. Une corrélation entre les données phénotypiques et les profils d'expression des gènes a été réalisée selon la méthode de Spearman.

Les résultats ont montré que le *rosetting* est le phénotype de cytoadhérence impliqué dans le paludisme grave d'importation avec une fréquence de *rosetting* plus élevée chez les voyageurs/expatriés présentant une forme grave et qu'il est identifié comme le seul facteur de risque de paludisme « très grave » parmi l'ensemble des phénotypes étudiés : les mesures de cytoadhérence aux récepteurs solubles n'ayant pas permis de mettre en évidence une relation entre un phénotype et les éléments étudiés. L'étude de l'expression des gènes *var* a révélé que

les groupes A et B ainsi que les domaines cassettes DC4, DC8 et DC13 étaient surexprimés dans les formes graves. De plus, il existe une corrélation entre les niveaux d'expression des domaines DBL α 2/1.1/2/4/7 et DBL β 3 et le phénomène de *rosetting* ainsi que de DBL α 2/1.1/2/4/7 avec le phénotype de cytoadhérence à ICAM-1.

Cette étude était la première à caractériser les phénotypes de cytoadhérence dans le cadre du paludisme d'importation et confirmait que le phénomène de *rosetting* est un phénotype majeur dans la survenue de l'accès palustre grave chez le voyageur/expatrié comme cela avait été déjà décrit chez les enfants en zone d'endémie. Ce travail confirmait également la surexpression des groupes de gènes *var* A, B et des domaines cassettes DC4, DC8 et DC13 dans le paludisme grave d'importation dont certains domaines protéiques tels que DBL α 2/1.1/2/4/7 et DBL β 3 présentaient, pour la première fois, un phénotype de cytoadhérence sur ICAM-1 et un phénotype de *rosetting*. Ce double phénotype pourrait expliquer l'implication majeure de DC8 dans le paludisme grave.

Les résultats de cette étude feront l'objet d'une publication future.

Etude du phénotype de cytoadhérence des isolats de *P. falciparum* dans le cadre du paludisme d'importation.

Introduction:

La séquestration parasitaire, spécifique à l'espèce *Plasmodium falciparum*, est considérée comme le principal mécanisme physiopathologique à l'origine des atteintes viscérales lors de l'accès palustre grave, liées à l'hypoperfusion d'organes par rétrécissement de la lumière des vaisseaux sanguins [67], [102]. Cette rétention des formes parasitaires dans les veinules post-capillaires, indispensable à la survie du parasite favorisant sa multiplication et son échappement à la clairance splénique [66], peut résulter d'une part, du phénomène de cytoadhérence des globules rouges parasités à la surface des cellules endothéliales de l'hôte infecté et d'autre part, de la liaison des globules rouges parasités avec d'autres globules rouges non parasités ou avec des plaquettes qui caractérise respectivement le phénomène de *rosetting* et de *clumping* [67], [68], [93], [102].

Les protéines parasitaires appartenant à la famille des VSA (*variant surface antigens*), exprimées à la surface du globule rouge parasité, semblent être impliquées dans ce mécanisme de cytoadhérence [73]. PfEMP1, constituée d'une succession de domaines protéines Duffy Binding Like (DBL) regroupés en 6 sous classes (α , β , γ , δ , ϵ et ζ) et de Cystein Rich Interdomain Region (CIDR) regroupées en 4 classes (α , β , γ et δ), est la protéine majoritaire de cette famille et reste le principal médiateur décrit dans cette interaction globule rouge parasité-récepteur cellulaire de l'hôte [72], [75], [76].

Ces protéines sont codées par une famille très polymorphe de gènes appelés les gènes *var*. La variabilité de séquences de ces gènes, résultant de recombinaisons multiples, est à l'origine d'un polymorphisme des séquences protéiques de PfEMP1 responsable d'un échappement à la

réponse immunitaire de l'hôte, et d'une variation du phénotype de cytoadhérence des globules rouges parasités [106]. Néanmoins, un groupe restreint de gènes *var* le plus souvent associé aux groupes de gènes A et B/A est exprimé préférentiellement dans les accès palustres graves [80], [81], [114], [115]. Ces gènes coderaient pour des protéines PfEMP1 semi-conservées, rapidement reconnaissables par le système immunitaire de l'hôte [168], [170], [171], dont les motifs protéiques les plus conservés appelés domaines cassettes (DC) [77] interagiraient avec les récepteurs cellulaires lors de la séquestration des globules rouges parasités [78]–[82].

Une quinzaine de récepteurs cellulaires (CD36 [68], [85], TSP [68], [85], ICAM-1 [68], [85], EPCR [92], [140], P-selectine, E-selectine, VCAM-1, PECAM-1, fractalkine/CX3CL1, CR1, HS, gC1qR/HABP/p32 [68], antigènes des groupes sanguins A et B [68], [89]), notamment présent à la surface des cellules endothéliales, des globules rouges, des leucocytes, des plaquettes et des adipocytes, ont été incriminés dans ces phénomènes de cytoadhérence ou de *rosetting*. Ces récepteurs interagissent avec certains domaines protéiques de PfEMP1 tel que CD36 et CIDR [75], [86], [87], EPCR et CIDR α 1 de DC8 et DC13 [75], [91], ICAM-1 et DBL β [75], [86], [87] dont DBL β 3 de DC4 [78] et enfin DBL α 1-CIDR β / γ / δ pour le *rosetting* [75], [94]. Trois principaux récepteurs (CD36 [85]–[88], [90], [110], ICAM-1 [85]–[88], [90] et récemment EPCR [91], [140]), ainsi que le phénomène de *rosetting* [93], [100], [188] ont été plus largement étudiés du fait de leur probable implication dans la cytoadhérence et la séquestration au cours de l'atteinte neurologique. Cependant certains résultats restent contradictoires avec des implications variables de différents récepteurs dans la cytoadhérence en fonction des études [86], [87], [90].

L'ensemble des résultats publiés ont principalement été obtenus *in vitro* à partir de souches de laboratoire sélectionnées dérivées de *Plasmodium falciparum* ou à partir d'isolats prélevés chez des enfants présentant un tableau clinique de neuropaludisme en zone d'endémie. A notre connaissance, il n'existe aucune étude de cytoadhérence menée à partir d'isolats

prélevés sur d'autres populations à risque ayant développé un neuropaludisme ou d'autres présentations cliniques d'accès palustre grave, permettant d'extrapoler les résultats obtenus antérieurement. La population de patients rencontrée dans le contexte de paludisme d'importation présente un intérêt pour des études de cytoadhérence, de part son hétérogénéité en termes d'âge, d'origine ethnique et d'exposition préalable au parasite, pouvant révéler l'influence de certains facteurs d'hôtes sur le phénotype d'adhérence de *Plasmodium falciparum*. L'étude précédemment réalisée sur le profil d'expression des gènes *var* et DC dans le cadre du paludisme d'importation a apporté des informations sur les interactions hôte-parasite. Néanmoins, une corrélation entre le phénotype de cytoadhérence et l'expression des gènes *var* et DC aurait l'avantage de préciser les mécanismes physiopathologiques mis en jeu en fonction du groupe de gènes exprimé. Dans le cadre de l'activité du CNR, l'objectif de cette étude a consisté en l'évaluation des phénotypes de cytoadhérence d'isolats cliniques de *Plasmodium falciparum* sur les 3 principaux récepteurs d'hôtes (CD36, ICAM-1 et EPCR) ainsi que sur le *rosetting* et d'établir une corrélation entre ce phénotype et l'expression des gènes *var* et DC.

Matériels et méthodes :

Recueil des données et des échantillons

Comme pour l'ensemble des travaux présentés précédemment, cette étude a été réalisée au laboratoire du CNR sur le site de l'hôpital Bichat-Claude Bernard entre 2013 et 2015. Pour chaque patient dont l'isolat était inclus, le recueil des données cliniques, épidémiologiques et biologiques a été effectué selon les mêmes modalités que précédemment décrites. Pour la détermination du phénotype de cytoadhérence, les critères d'inclusions des échantillons étaient : données épidémiologiques, cliniques et biologiques disponibles pour chaque patient associé à l'échantillon, infection par *P. falciparum* seul à une parasitémie viable supérieure à

4500 parasites/ μ l confirmée au laboratoire du CNR, échantillon de sang total ayant servi au diagnostic disponible au laboratoire du CNR dans un délai de 48 heures maximum par rapport au prélèvement en quantité suffisante et absence d'un traitement antipaludique curatif dans les 30 derniers jours, confirmée par un dosage plasmatique des principaux antipaludiques sur le prélèvement inclus.

Traitement des échantillons inclus

L'ensemble des techniques utilisées pour le diagnostic du paludisme au laboratoire du CNR ont été décrites dans les objectifs de mes travaux et dans les études précédentes. L'altération des formes parasitaires a été évaluée en pourcentage de formes altérées, après lecture du frottis sanguin au laboratoire du CNR, permettant d'estimer la parasitémie des formes viables dans le prélèvement de sang total.

Après centrifugation, le plasma du J0 était congelé à -20°C en attendant le dosage des antipaludiques. Si le volume de sang total était suffisant, le culot de globules rouges parasités était lavé 3 fois au RPMI, déleucocyté par aspiration du buffy coat à la propipette après le troisième lavage et mélangé avec du Trizol® Reagents (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA) à une proportion de 5 volumes de Trizol® par volume de culot globulaire parasité avant d'être congelé à -80°C .

Mise en culture des isolats des patients

Les isolats cliniques de *Plasmodium falciparum* répondant aux critères d'inclusion ont été mis en culture pour maturation en formes trophozoïtes âgés/schizontes dans une suspension contenant des globules rouges sains du groupe O⁺ (Etablissement Français du Sang, Rungis, France) et du milieu RPMI Gibco® 1640 (Life technologies®; Carlsbad, California, USA) supplémenté avec 10% de sérum humain du groupe AB (Biowest®; Nuaille, France), de l'HEPES 0.5% (Sigma-Aldrich®; Saint Louis, Missouri, USA) et du NaHCO₃ (Sigma-

Aldrich®; Saint Louis, Missouri, USA) à un taux d'hématocrite final de 5%. La suspension parasitaire était mise à incuber à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 95% d'humidité et composée d'un mélange gazeux de CO₂ à 5%, O₂ à 10% et N₂ à 85%.

Evaluation du Rosetting

Lorsque la proportion des formes parasitaires matures avait atteint au minimum 30% pour un délai inférieur à 45 heures de culture, 100 µl de la suspension cellulaire en culture étaient prélevés à température ambiante et mélangés avec 2 µl d'acridine orange (Euromedex, Souffelweyersheim, France) à 0.01% dans du *Phosphate Buffered Salt* 1X (PBS) après avoir ramené l'hématocrite de la suspension de culture à 2% après dilution par du RPMI. Trois dépôts de 10 µl de ce mélange sont ensuite observés entre lame et lamelle (22 X 22 mm) sous un microscope à fluorescence. Le pourcentage de formes en rosettes, correspondant à la fixation d'un globule rouge parasité à au moins deux globules rouges non parasités, a ensuite été estimé après observation de 300 formes parasitaires totales par lamelle. Cette proportion de formes en rosettes était ensuite normalisée par le pourcentage de formes parasitaires matures présentes dans la suspension de culture.

A cette étape post-culture, 200 µl de culture étaient également prélevés et mélangés avec du Trizol® Reagents (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA) à une proportion de 5 volumes de Trizol® par volume de suspension parasitaire avant d'être congelé au -80°C.

Sélection des formes schizontes au MACS

Le reste de la suspension parasitaire était ensuite passé sur séparateur cellulaire MACS LD columns selon les recommandations du fabricant (Miltenyi-Biotec, Paris, France). La suspension de formes parasitaires matures concentrée était ensuite réadaptée à 10.000.000 GR/ml et à une parasitémie de 26% dans un milieu RPMI/BSA 3% (*Bovin Serum Albumin*) avant la détermination du phénotype de cytoadhérence.

Coating des boîtes de pétri et cytoadhérence

La détermination du phénotype de cytoadhérence des isolats de *Plasmodium falciparum* était réalisée en triplicata sur les récepteurs solubles coatés CD36 et ICAM-1 à 5 µg/ml (R&D systems, Abingdon, UK) ainsi que sur EPCR à 20 µg/ml (Sino Biological Incorporation, Beijing, China). Pour coater les boîtes, 3 dépôts de 20 µl de chaque suspension de récepteurs solubles aux concentrations indiquées ci-dessus sont effectués sur une boîte de pétri plastique non traitée (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) et incubés 2 heures à + 4°C. Après aspiration des dépôts, les spots sont saturés par 20 µl d'une suspension de PBS/BSA 3% et mis à incuber 1 heures à l'étuve à 37°C.

Après aspiration des spots de PBS/BSA 3%, 20 µl de suspension parasitaire enrichie en formes schizontes après concentration au MACS étaient incubés quinze minutes à température ambiante sur les spots de récepteurs puis lavés au PBS 1X. Après fixation overnight à température ambiante des spots au glutaraldéhyde 1.5 % (Sigma-Aldrich®; Saint Louis, Missouri, USA), les globules rouges parasités cytoadhérents aux récepteurs solubles coatés sur boîte de pétri étaient observés sous un microscope inversé à l'objectif X32 après coloration au Giemsa 8 %. Les résultats de cytoadhérence étaient exprimés en moyenne du nombre de globules rouges parasités cytoadhérents par mm² après lecture de 5 champs microscopiques de 1 mm de diamètre pour chaque spot de récepteurs solubles.

Extraction d'ARN et RT-PCR

L'extraction d'ARN est effectuée comme précédemment avec du Trizol® Reagents (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA), selon les recommandations du fabricant. L'ARN extrait est traité par la DNase I, Amplification Grade® (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA) pour éliminer les risques de contamination par de l'ADN humain avant la

réaction de RT réalisée avec le kit commercial Superscript® VILO™ (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA).

Expression des gènes *var* et des domaines cassettes

L'expression des groupes de gènes *var* a été étudiée via 9 couples de primers déjà utilisés lors de l'étude précédente (A1, A3, B1, B2, C1, C2, BC1, BC2 et var1) avec le gène séryl-tRNA synthétase (couple de primers p90) comme contrôle endogène. Les réactions de RT-PCR se sont déroulées dans les mêmes conditions que précédemment dans un mélange de 15µl, incluant 0.5 µl d'ADNc, 7.5 µl de Power SYBR® green PCR Master Mix (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA) and 250 nM de primers, sur un appareil de PCR en temps réel ViiA™ (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA). Chaque échantillon d'ADNc est analysé en double pour chaque couple de primers à un seuil de mesure fixé à 0.1. L'expression relative (ER) pour les 9 couples de primers et p90 est calculée selon la même méthode décrite qu'auparavant.

Les 11 couples de primers décrits lors du travail antérieur ont été réutilisés pour l'étude de l'expression des DC avec le gène séryl-tRNA synthétase (couple de primers p90) utilisé comme contrôle endogène. La réaction de RT-PCR est réalisée dans les mêmes conditions dans un mélange de 20 µl, incluant 2 µl d'ADNc, 10 µl de Power SYBR® green PCR Master Mix (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA) et 1 µM de primers, sur un appareil de PCR en temps réel ViiA™ (Life Technologies®, Carlsbad, California, USA). Chaque échantillon d'ADNc est analysé à un seuil de mesure fixé à 0.1. L'abondance des transcrits est estimé suivant la même approche en Tu.

Population de patients de l'étude

Les patients dont les isolats ont été inclus, ont été catégorisés en 4 groupes d'exposition tels que les migrants de première génération (MPG) (nés en zone d'endémie et résidants en

France), les migrants de deuxième génération (MSG) (nés en France de parents migrants et résidants en France), les résidents (R) (nés et résidants en Afrique) et les voyageurs/expatriés (nés en France et résidants en France ou en zone d'endémie (expatriés)). La classification clinique utilisée dans les travaux antérieurs a également été conservée avec les cas de paludisme « très grave » (PTG), les cas de paludisme « grave » (PG) et les cas d'accès palustre simple (APS).

Analyses statistiques

Le recrutement des isolats de patients sur cette période a été réalisé dans l'objectif d'obtenir des groupes cliniques de tailles égales et comparables pour l'étude du phénotype d'adhésion des isolats.

Les variables quantitatives sont présentées sous forme de moyenne et de déviation standard si elles sont normalement distribuées et sous de forme de médiane [25th percentile-75th percentile] pour les variables non normalement distribuées. Les variables qualitatives catégorielles sont présentées sous forme de nombre et de fréquence (%). La quantité de globules rouges parasités adhérents, la fréquence de *rosetting*, les niveaux d'expression des groupes de gènes *var* et des domaines cassettes ont été transformés en $\log(10)$ afin de normaliser leurs valeurs pour les analyses statistiques. Pour les isolats de patients avec une fréquence de *rosetting* nulle, nous avons assumé une valeur log-transformée assimilée à 0. Pour les gènes avec un niveau d'expression indétectable, une valeur deux fois inférieure à la valeur minimale de ce gène leur a été attribuée [202].

Les tests de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer la relation entre des variables quantitatives continues et des groupes, le test du χ^2 et le test de Fisher's exact pour comparer des variables catégorielles entre les groupes. Pour chaque test, les différences étaient considérées comme significatives si $p \text{ value} < 0.05$. La correction de

Bonferroni a été réalisée pour les comparaisons multiples entre données quantitatives et les groupes de patients. L'ensemble des tests statistiques a été effectué sur le logiciel STATA, version 12 (Stata corp®, College station, Texas, USA).

Analyse factorielle

Le regroupement de notre population en groupes d'études par clusterisation suivant les données cliniques, épidémiologiques et biologiques des patients a été effectué selon la même méthodologie en 2 étapes que celle de nos précédents travaux.

L'analyse factorielle de données mixtes a permis de regrouper et de projeter les individus dans un repère factoriel suivant des axes explicatifs déterminés à partir des données quantitatives telles que l'âge des patients et les niveaux d'expression des gènes *var* et DC et de la donnée qualitative de l'origine ethnique des patients. Cette analyse a été complétée par une classification hiérarchique ascendante afin d'identifier et définir les clusters de patients. La présentation clinique a été considérée comme la variable illustrative de la typologie des données alors que les autres variables ont été considérées comme actives. L'ensemble des analyses factorielles et de clusterisation ont été réalisées à partir du logiciel TANAGRA, version 1.4.

Résultats

Caractéristiques de la population d'étude

Sur la période de 2013 à 2015, les isolats de 51 patients ont été inclus dans cette étude *in vitro* des phénotypes de cytoadhérence de *Plasmodium falciparum* dans le paludisme d'importation. Les patients étaient des hommes pour quasiment la moitié de l'effectif de ce groupe (49%) dont la moyenne d'âge était de 40.1 ± 16.7 ans. La majorité des patients était des migrants de première génération (56.9 %) suivis par les voyageurs/expatriés (17.7%), les

patients résidents en zone d'endémie (13.7%) et les migrants de 2^{ème} génération (11.8%). L'Afrique de l'Ouest restait la zone d'endémie la plus visitée (70%) suivie par l'Afrique Centrale (30%) (Tableau 9).

Le groupe de patients avec un paludisme « très grave » présentait un tableau clinique d'atteintes neurologiques dans 55.6% qui pouvait être combiné avec un état de choc présent dans 27.8% des cas, une hyperlactatémie (55.6 %), une insuffisance rénale aigüe (38.9%) et une hyperparasitémie (77.8%). Les cas de paludisme « grave » se caractérisaient par une hyperparasitémie (82.4 %) et un ictère clinique (23.5 %) ou biologique (35.7 %). Il n'y avait pas de différences significatives entre nos trois groupes cliniques en termes d'âge, de proportions de chaque catégorie de patients exposés, du nombre d'antécédents de paludisme déclaré, de la prise de chimioprophylaxie, du taux d'hémoglobine, du nombre de leucocytes ou de plaquettes. Néanmoins, de manière non significative, l'âge semble plus élevé chez les MPG et V/E et la proportion de MPG dans le groupe des APS (48%) a tendance à être plus importante que pour les 3 autres groupes d'exposition (<20%). La parasitémie est significativement différente entre les groupes cliniques avec une charge parasitaire plus importante dans le groupe de paludisme grave par rapport aux APS (correction de Bonferroni ; $p = 0.0002$).

Tableau 9 : Caractéristiques épidémiologiques et biologiques des patients inclus entre 2013 et 2015 pour l'étude de phénotypage de la cytoadhérence dans le cadre du paludisme d'importation.

	PTG (n=18)	PG (n=17)	APS (n=16)	P value	Total (n=51)
Age (année)*	43.7±17.4	33.6±17.8	43.1±13.5	0.07	40.1±16.7
Homme N (%)**	10 (55.6)	8 (47)	7 (43.8)	0.87	25 (49)
MPG N (%)**	7 (38.9)	8 (47)	14 (87.5)		29 (56.9)
MSG N (%)**	2 (11.8)	3 (16.7)	1 (6.3)	0.07	6 (11.8)
V/E N (%)**	5 (29.4)	3 (16.7)	1 (6.3)		9 (17.7)
R N (%)**	4 (23.5)	3 (16.7)	0 (0)		7 (13.7)
Antécédents**	5 (41.7)	7 (63.6)	4 (50)	0.6	16 (51.6)
Chimio prophylaxie**	2 (11)	1 (6)	2 (13)	0.9	5 (10)
Hb (g/dl)***	11.9 [10.7-14.1]	12.9 [10.9-14.1]	12.6 [11.2-15.2]	0.5	12.3 [11-14.2]
Leucocytes (G/L)***	6.5 [4.75-9.15]	5.6 [4.4-5.9]	5.4 [4-6.4]	0.13	5.6 [4.4-7.1]
Plaquettes (G/L)***	51 [37-58.5]	64.5 [36-102.5]	57 [30-94.5]	0.22	55 [34-82.5]
Parasitémie (parasites/µl)***	281250 [180000-378000]	306000 [234000-360000]	64125 [40500-119250]	0.0002	184500 [63000-315000]

*Les variables normalement distribuées sont représentées par leur moyenne ± leur déviation standard.

**Les variables catégorielles qualitatives sont représentées par leur valeur absolue et leur fréquence (%).

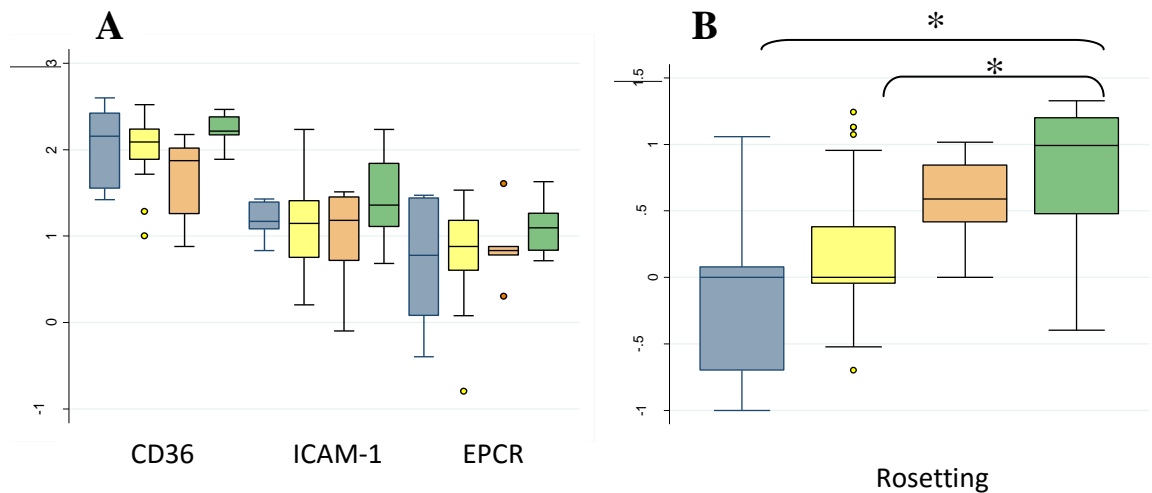
***Les variables non normalement distribuées sont représentées par leur médiane [25th percentile-75th percentile].

Relation entre le tableau clinique, l'origine ethnique et la cytoadhérence

Le nombre de globules rouges cytoadhérant aux différents récepteurs a été comparé entre les groupes cliniques PTG, PG et APS et aucune différence significative entre les groupes n'a été mise en évidence.

En revanche, la comparaison des profils de cytoadhérence et de *rosetting* entre les 4 groupes d'exposition révèle une différence significative pour le phénotype de *rosetting* ($p = 0.01$). La fréquence de *rosetting* est significativement augmentée chez les V/E par rapport au MPG et au R ($p = 0.01$ et $p = 0.02$ respectivement pour V/E vs. MPG et V/E vs. R) alors qu'aucune différence n'est observée entre les V/E et les MSG (figure 20 a et b). Une différence non significative est observée pour les récepteurs CD36 ($p = 0.053$) avec une tendance vers une

augmentation du nombre de globules rouges cytoadhérents à ce récepteur chez les MPG, les R et les V/E. Tout phénotype de cytoadhérence confondu, les isolats du groupe des V/E semblaient montrer une cytoadhérence plus élevée sur chaque récepteur par rapport aux isolats des autres groupes d'exposition.



Cytoadhérence en fonction de la catégorie d'exposition des patients : résidents (R) (bleu), migrants de première génération (MPG) (jaune), migrants de deuxième génération (MSG) (orange) et voyageurs/expatriés (V/E) (vert), estimée en GR parasités/mm² pour les récepteurs CD36, ICAM-1 et EPCR (A) et en pourcentage de rosettes pour le *rosetting* (B). Les valeurs de *rosetting* et le nombre de GR parasités ont été transformés en log(10). * signifie une p value < 0.05.

Figure 20 : Niveau de cytoadhérence aux récepteurs CD36, ICAM-1 et EPCR (A) et fréquence de *rosetting* (B) en fonction du groupe de patients exposés.

Facteurs de risque de l'accès palustre grave

Une étude multivariée par régression linéaire a été réalisée à partir des variables significatives mises en évidence lors des études univariées afin d'identifier les principaux facteurs de risque associés à la survenue d'un accès palustre grave (Tableau 10).

Le jeune âge semble être le seul facteur de risque favorisant l'apparition d'une forme « grave » de l'infection palustre (OR 0.93 ; p = 0.011). Dans l'accès palustre « très grave », les migrants de première et de deuxième génération sont des variables associées à une diminution de la survenue d'un accès palustre « très grave » (OR de 0.02 et 0.03 ; p = 0.01 et p = 0.048 respectivement) alors que l'âge et surtout le *rosetting* sont des facteurs de risque

associés à la survenue d'un accès « très grave » (OR de 1.1 et 7.5 ; $p = 0.023$ et $p = 0.018$ respectivement).

Influence de la maturation en culture sur l'expression des gènes *var*

Avant d'analyser l'expression des gènes *var* aux stades parasitaires matures, les profils d'expression des gènes *var* et des DC ont été comparés avant et après maturation parasitaire en culture à partir de 5 isolats de patients (A, B, C, D, E) (figure 21) pour évaluer l'influence de la maturation sur l'expression des *var* comme cela a déjà pu être évoqué [208].

Il a été constaté qu'après la phase de maturation, l'expression des gènes *var* et DC était significativement diminuée, plus spécifiquement pour les gènes A3 ($p = 0.02$), B2 ($p = 0.01$), BC2 ($p = 0.03$), DBL β 12 ($p = 0.01$), DBL β 3 ($p = 0.03$) et DBL γ DC5 ($p = 0.004$).

Tableau 10 : Relation entre le phénotype d'adhérence des isolats cliniques de *Plasmodium falciparum* et la présentation clinique de l'infection palustre.

APS	Variable	OR	95%IC	P value
	age	1.01	[0.97-1.07]	0.57
	résident	1.00 (reference)		
	MPG	7.2 e ⁺⁷	0	0.99
	MSG	2.9 e ⁺⁷	0	0.99
	V/E	2.0 e ⁺⁷	0	0.99
	CD36	1.3	[0.16-10.4]	0.79
	ICAM-1	0.6	[0.14-2.4]	0.5
	EPCR	0.43	[0.07-2.5]	0.35
	rosetting	0.34	[0.08-1.5]	0.15
PG				
	age	0.93	[0.88-0.98]	0.011
	résident	1.00 (reference)		
	MPG	1.4	[0.16-12]	0.76
	MSG	3.5	[0.18-66.4]	0.41
	V/E	1.68	[0.1-30.2]	0.35
	CD36	5.1	[0.36-71.6]	0.23
	ICAM-1	2.5	[0.56-10.7]	0.23
	EPCR	4.1	[0.62-27.7]	0.14
	rosetting	0.5	[0.13-1.9]	0.3
PTG				
	age	1.1	[1.01-1.14]	0.023
	résident	1.00 (reference)		
	MPG	0.02	[0.001-0.4]	0.01
	MSG	0.03	[0.001-0.1]	0.048
	V/E	0.06	[0.002-1.65]	0.1
	CD36	0.15	[0.015-1.4]	0.1
	ICAM-1	0.8	[0.18-3.4]	0.74
	EPCR	0.42	[0.1-2.3]	0.32
	rosetting	7.5	[1.4-40.2]	0.018

*La régression logistique a été réalisée sur 51 patients. L'âge des patients, les groupes de patients exposés (résidents de zone d'endémie (R), migrants de première génération (MPG), migrants de seconde génération (MSG), voyageurs/expatriés (V/E)) et le phénotype de cytoadhérence ont été sélectionnés comme facteurs de risque potentiels après analyse univariée. Pour les groupes de patients exposés, les patients résidents en zone d'endémie ont été choisis comme référence. L'âge et CD36, ICAM-1, EPCR et *rosetting* ont été traités comme des variables continues. Les valeurs de quantification de la cytoadhérence ont été log-transformées pour l'analyse. Le seuil de significativité est de p value < 0.05. OR, odds ratio; IC, intervalle de confiance.

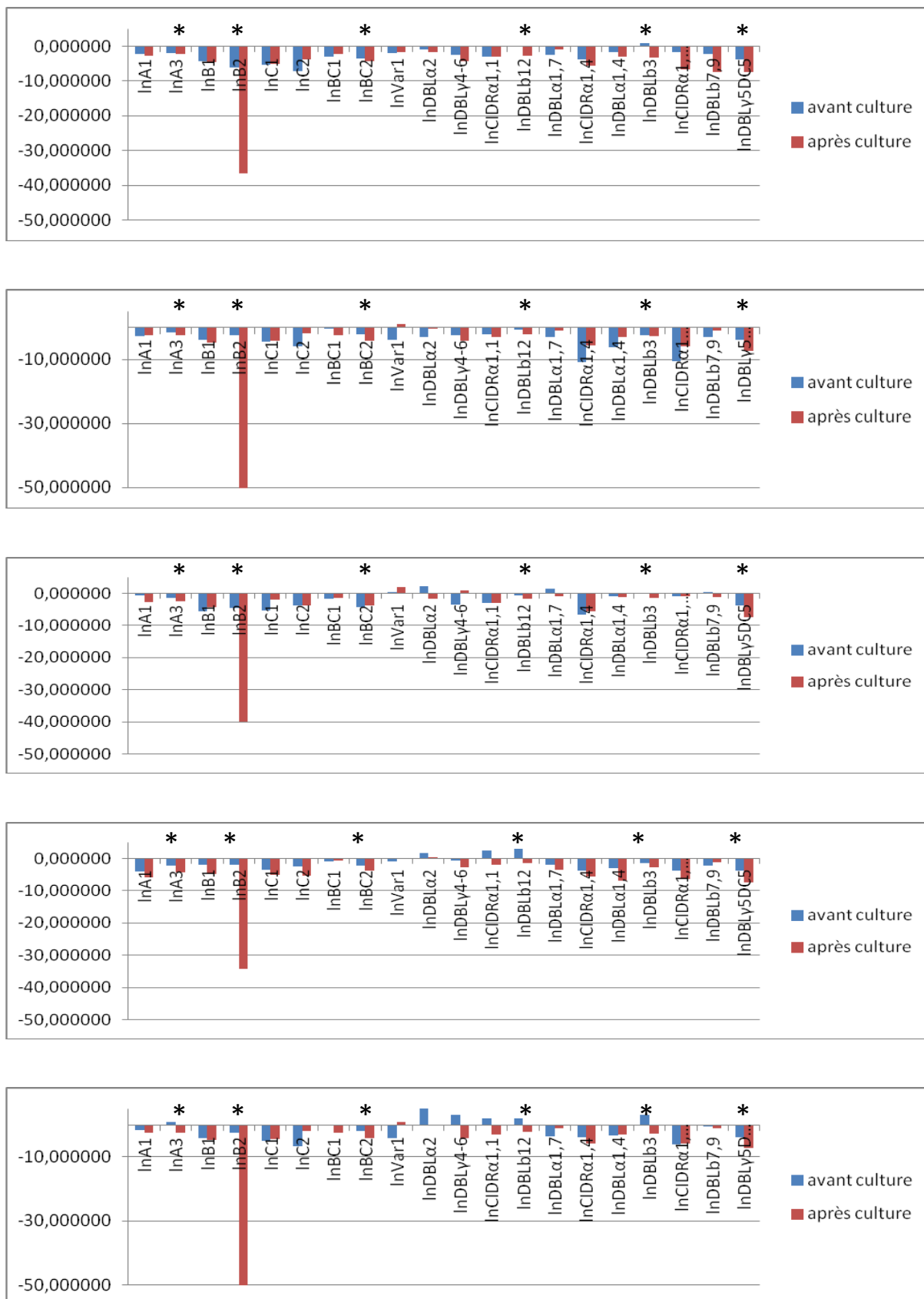


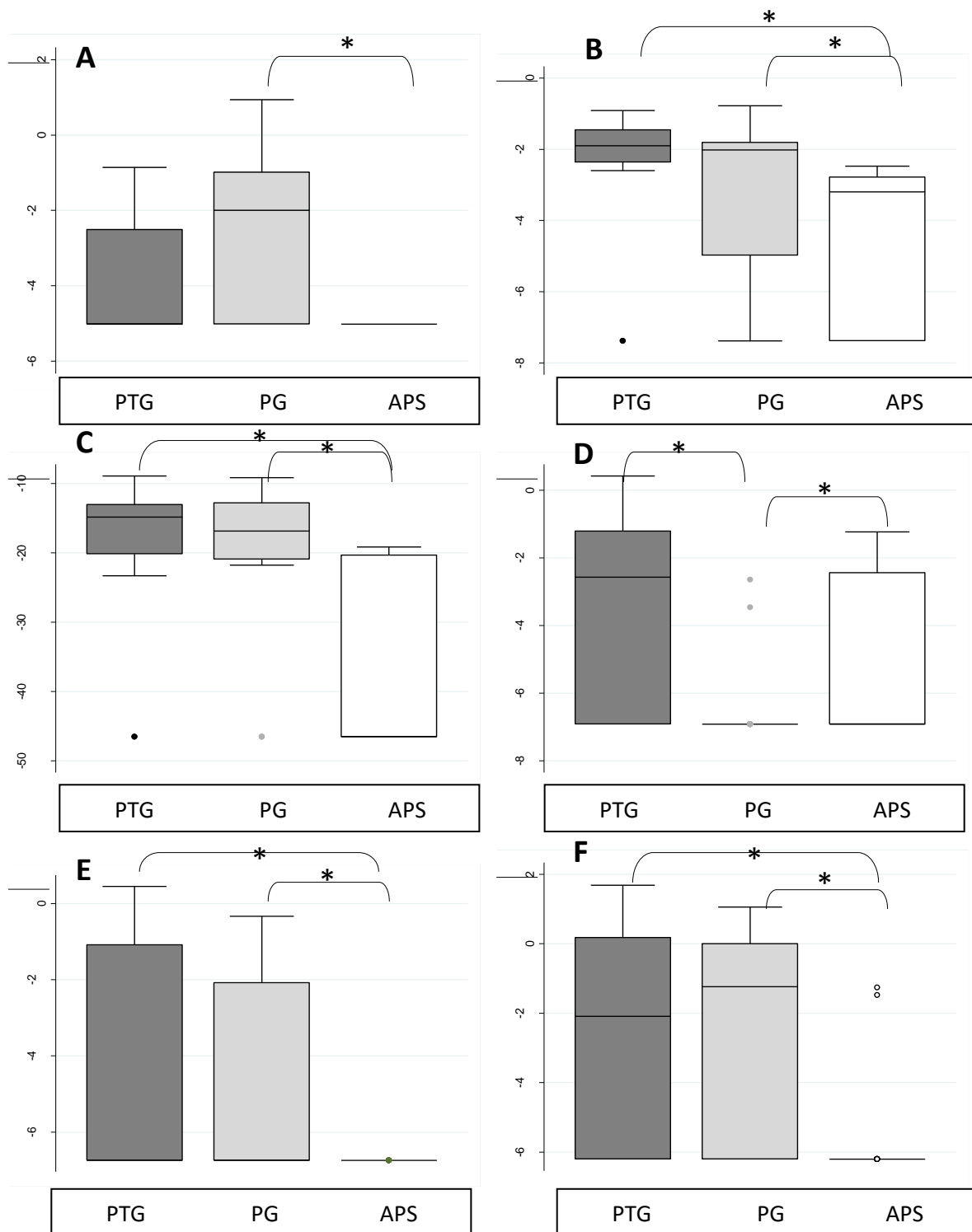
Figure 21 : Niveau d'expression des gènes *var* et DC avant et après maturation en culture pour chaque isolat testé.

Expression des gènes *var* et des DC après maturation *in vitro*

Sur les 51 isolats inclus, l'analyse du profil d'expression des gènes *var* après maturation n'avait pu être réalisée que pour 40 patients et l'analyse des DC pour 50 patients.

Comme dans l'étude précédente, les résultats de l'expression des gènes *var* ont été analysés en fonction de la présentation clinique et de l'origine ethnique des patients.

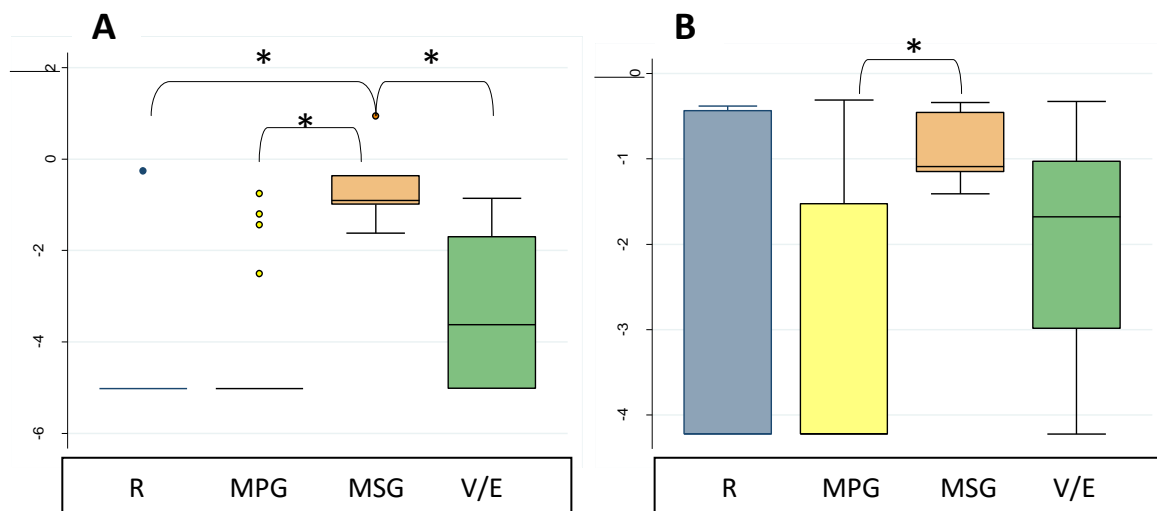
Lorsque l'expression des gènes *var* et DC a été comparée entre les groupes cliniques PTG, PG et APS dans notre population d'étude, une différence significative de l'expression des gènes A1 ($p = 0.03$), B1 ($p = 0.014$), B2 ($p = 0.015$), DBL γ 4/6 ($p = 0.004$), CIDR α 1.1 ($p = 0.015$) et DBL β 3 ($p = 0.005$) a été mise en évidence (figure 22a-f). L'expression du groupe de gènes A1 était significativement surexprimée dans le groupe de PG ($p = 0.02$ pour PG vs. APS) et tendait de manière non significative à être augmentée dans le groupe clinique du PTG. Les groupes de gènes B1, B2, CIDR α 1.1 et DBL β 3 étaient surexprimés dans les groupes de PG ($p = 0.004$; $p = 0.005$; $p = 0.004$; $p = 0.005$ respectivement pour B1, B2, CIDR α 1.1 et DBL β 3 avec PTG vs. APS) et de PTG ($p = 0.04$; $p = 0.01$; $p = 0.01$; $p = 0.002$ respectivement pour B1, B2, CIDR α 1.1 et DBL β 3 avec PG vs. APS). Le niveau d'expression de DBL γ 4/6 est significativement sous exprimé dans le groupe PG ($p = 0.001$ pour PTG vs. PG et $p = 0.047$ pour PG vs. APS).



Niveaux d'expression des gènes *var A1* (A), *B1* (B), *B2* (C) et *DC DBL γ 4/6* (D), *CIDR α 1.1* (E), *DBL β 3* (F) en fonction de la présentation clinique divisée en cas de paludisme « très grave » (boîte noir), de paludisme « grave » (boîte grise) et de paludisme « simple » (boîte blanche). * signifie une p-value < 0.05. Le niveau d'expression des gènes est transformé en log₁₀ pour la représentation graphique.

Figure 22 : Expression des gènes *A1* (A), *B1* (B), *B2* (C), *DBL γ 4/6* (D), *CIDR α 1.1* (E) et *DBL β 3* (F) en fonction de la catégorie clinique des patients.

En ce qui concerne la comparaison des expressions des gènes *var* et DC en fonction du groupe de patients exposés, les gènes A1 ($p = 0.002$) et A3 ($p = 0.04$) étaient significativement différents entre les groupes de patients avec une surexpression du groupe de gènes A1 chez les MSG ($p = 0.0004$ pour MPG vs. MSG ; $p = 0.01$ pour MSG vs. V/E et $p = 0.02$ pour MSG vs. R) et une augmentation de l'expression de A3 également chez les MSG ($p = 0.007$ pour MSG vs. MPG). Aucune différence significative n'a été observée pour l'expression des DC en fonction du groupe de patients exposés.



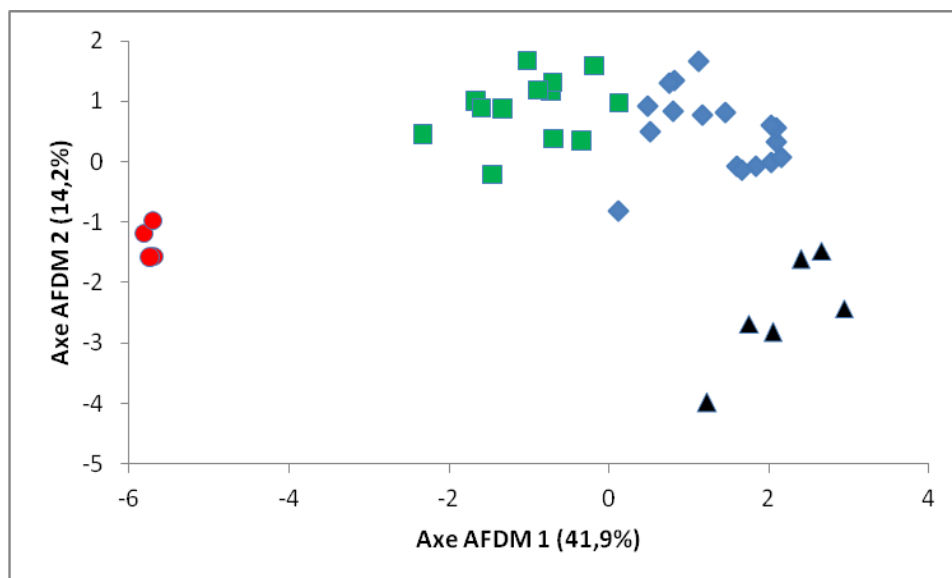
Niveaux d'expression des gènes *var* A1 (A) et A3 (B) en fonction de la catégorie d'exposition des patients : résidents en zone d'endémie (bleu), migrants de 1^{ère} génération (MPG) (jaune), migrants de 2nd génération (orange) et les voyageurs/expatriés (V/E) (vert). * signifie une p -value < 0.05 . Les niveaux d'expression des gènes sont transformés en $\log(10)$ dans cette représentation graphique.

Figure 23 : Niveau d'expression des gènes du groupe A1 (A) et A3 (B) en fonction du groupe d'exposition des patients.

Identification de sous population

Selon la même méthodologie que celle utilisée pour le travail précédent, une clusterisation des patients de notre groupe a été effectuée suivant une analyse factorielle de données mixtes prenant en compte l'âge des patients, la présentation clinique, l'origine ethnique des patients et le niveau d'expression des gènes *var* et des DC.

L'analyse factorielle de données mixtes, réalisée pour l'expression des gènes *var*, a permis d'identifier pour 40 patients (11 patients avec données manquantes) 2 principaux axes factoriels expliquant respectivement 41.9 % et 14.2% des données de la population. Le regroupement des patients en fonction de ces axes factoriels explicatifs pour le niveau d'expression des groupes de gènes *var* avait produit 4 groupes ou clusters respectivement de 4, 6, 13 et 17 patients qui peuvent être visualisés sur le scatterplot de la figure 24. Le cluster 1 (rond rouge) et le cluster 2 (triangle noir) représentaient des populations très bien distinctes des 2 autres clusters 3 (carré vert) et cluster 4 (losange bleu) qui sont plus proches, présentant probablement des traits de similarités.



Représentation en scatterplot des patients présents dans le cluster 1 (rond rouge), le cluster 2 (triangle noir), le cluster 3 (carré vert) et le cluster 4 (losange bleu) suivant les axes 1 (41.9% des valeurs expliquées) et 2 (14.2% des valeurs expliquées). Ces axes explicatifs ont été déterminés à partir des variables âge, groupes d'exposition (R, MPG, MSG et V/E) et niveaux d'expression des gènes *var*.

Figure 24 : Scatterplot des clusters de patients suivant les axes factoriels explicatifs obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, et des niveaux d'expression des groupes de gènes *var*.

Les caractéristiques avec l'importance de chaque variable quantitative et catégorielle sont représentées pour chaque cluster dans le tableau 11.

Description des clusters Var															
Cluster 1				Cluster 2				Cluster 3				Cluster 4			
Effectif [%]		4 [10 %]		Effectif [%]		6 [15 %]		Effectif [%]		13 [32.5 %]		Effectif [%]		17 [42.5 %]	
Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population
Variables continues: moyenne (déviat standard)				Variables continues: moyenne (déviat standard)				Variables continues: moyenne (déviat standard)				Variables continues: moyenne (déviat standard)			
Age	0,25	41,25 (15,99)	39,18 (17,40)	A1	4,19	-0,53 (0,87)	-3,65 (1,95)	Age	1,78	46,31 (12,03)	39,18 (17,40)	BC1	3,29	-0,53 (0,43)	-1,37 (1,37)
A1	-1,46	-5,02 (0,00)	-3,65 (1,95)	A3	2,86	-0,81 (0,46)	-2,59 (1,63)	C2	1,47	-2,37 (2,56)	-3,34 (2,85)	B2	3,26	-14,62 (2,99)	-22,79 (13,46)
A3	-2,09	-4,22 (0,00)	-2,59 (1,63)	B2	1,68	-14,16 (4,95)	-22,79 (13,46)	BC2	-0,24	-2,17 (0,38)	-2,09 (1,55)	B1	3,17	-1,73 (0,50)	-3,07 (2,27)
C2	-3,23	-7,76 (0,00)	-3,34 (2,85)	C2	1,51	-1,70 (0,65)	-3,34 (2,85)	Var1	-0,50	-0,72 (0,43)	-0,60 (1,07)	Var1	3,16	0,03 (0,63)	-0,60 (1,07)
B2	-3,68	-46,56 (0,00)	-22,79 (13,46)	B1	1,47	-1,80 (0,53)	-3,07 (2,27)	C1	-0,66	-2,80 (1,75)	-2,54 (1,69)	BC2	3,03	-1,22 (0,50)	-2,09 (1,55)
B1	-3,96	-7,38 (0,00)	-3,07 (2,27)	C1	1,11	-1,83 (0,39)	-2,54 (1,69)	BC1	-0,77	-1,62 (0,61)	-1,37 (1,37)	C1	2,24	-1,84 (1,11)	-2,54 (1,69)
C1	-3,98	-5,76 (0,00)	-2,54 (1,69)	BC1	0,97	-0,87 (0,57)	-1,37 (1,37)	B1	-1,92	-4,07 (2,37)	-3,07 (2,27)	A3	2,18	-1,92 (1,42)	-2,59 (1,63)
Var1	-5,12	-3,24 (0,00)	-0,60 (1,07)	BC2	0,83	-1,60 (0,86)	-2,09 (1,55)	B2	-2,37	-30,14 (13,72)	-22,79 (13,46)	A1	0,73	-3,39 (1,83)	-3,65 (1,95)
BC1	-5,37	-4,90 (0,00)	-1,37 (1,37)	Var1	0,58	-0,36 (0,47)	-0,60 (1,07)	A1	-3,03	-5,02 (0,00)	-3,65 (1,95)	Age	0,44	40,59 (16,78)	39,18 (17,40)
BC2	-5,61	-6,26 (0,00)	-2,09 (1,55)	Age	-3,14	18,33 (17,24)	39,18 (17,40)	A3	-3,14	-3,76 (1,12)	-2,59 (1,63)	C2	-0,53	-3,62 (2,82)	-3,34 (2,85)
Variables catégorielles : [répartition dans le groupe] %				Variables catégorielles : [répartition dans le groupe] %				Variables catégorielles : [répartition dans le groupe] %				Variables catégorielles : [répartition dans le groupe] %			
PG	1,49	[18,8 %] 75,0 %	40,0 %	MSG	5,62	[100,0%] 83,3 %	12,5 %	APS	4,15	[100,0%] 53,8 %	17,5 %	V/E	2,84	[87,5 %] 41,2 %	20,0 %
R	0,41	[14,3 %] 25,0 %	17,5 %	PG	1,43	[25,0 %] 66,7 %	40,0 %	MPG	3,00	[55,0 %] 84,6 %	50,0 %	PTG	1,13	[52,9 %] 52,9 %	42,5 %
V/E	0,26	[12,5 %] 25,0 %	20,0 %	R	-0,06	[14,3 %] 16,7 %	17,5 %	R	-0,24	[28,6 %] 15,4 %	17,5 %	PG	0,77	[50,0 %] 47,1 %	40,0 %
MPG	0,00	[10,0 %] 50,0 %	50,0 %	PTG	-0,49	[11,8 %] 33,3 %	42,5 %	PTG	-0,35	[29,4 %] 38,5 %	42,5 %	R	0,02	[42,9 %] 17,6 %	17,5 %
PTG	-0,74	[5,9 %] 25,0 %	42,5 %	APS	-1,21	[0,0 %] 0,0 %	17,5 %	MSG	-1,64	[0,0 %] 0,0 %	12,5 %	MPG	-0,95	[35,0 %] 41,2 %	50,0 %
MSG	-0,79	[0,0 %] 0,0 %	12,5 %	V/E	-1,31	[0,0 %] 0,0 %	20,0 %	V/E	-2,17	[0,0 %] 0,0 %	20,0 %	MSG	-2,03	[0,0 %] 0,0 %	12,5 %
APS	-0,96	[0,0 %] 0,0 %	17,5 %	MPG	-2,62	[0,0 %] 0,0 %	50,0 %	PG	-2,86	[6,3 %] 7,7 %	40,0 %	APS	-2,47	[0,0 %] 0,0 %	17,5 %

Tableau représentant les clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupes d'exposition (R, MPG, MSG et V/E) et niveaux d'expression des gènes *var*. L'ordre de représentation des différentes variables quantitatives et qualitatives est fonction de la valeur du test-value dans chaque cluster. Les variables significativement différentes dans chaque cluster par rapport à la population générale sont représentées en gras sur fond orange. Les valeurs du niveau d'expression des gènes ont été transformées en $\log(10)$.

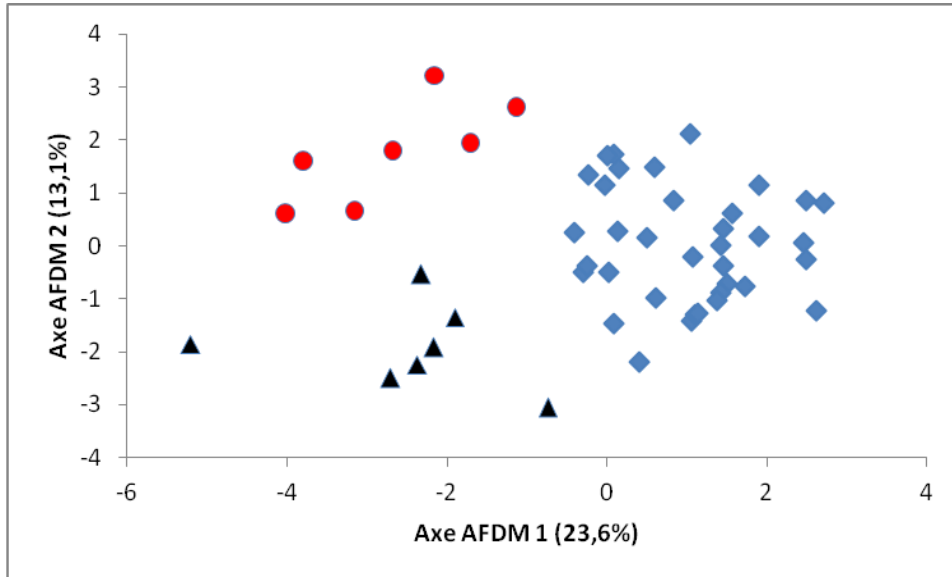
Tableau 11 : Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition et des niveaux d'expression des gènes *var*.

L'ensemble des données comparées nous permet de faire ressortir les caractéristiques de ces 4 clusters :

- Le cluster 1 est un groupe de patients plus âgés que la population générale, sans groupe d'exposition spécifique, présentant un PG. Au niveau de l'expression des gènes, une diminution de l'ensemble des gènes avec néanmoins une expression plus importante d'A1 et A3 et une forte diminution de l'expression de Var1, BC1 et BC2.
- Le cluster 2 est caractérisé par une proportion significative de jeunes patients MSG présentant un PG et d'une diminution significative de MPG. Les groupes de gènes A1 et A3 étaient surexprimés dans ce groupe.
- Le cluster 3 est composé en majorité de patients âgés MPG présentant un APS. Une diminution significative de la proportion de V/E et de cas de PG était également observée. Dans ce groupe, le groupe C1 était surexprimé et les gènes B1, B2, A1 et A3 étaient significativement sous exprimés par rapport à la population générale.
- Le cluster 4 regroupe significativement les V/E présentant un PTG et une faible proportion de MSG et de cas d'APS. Le niveau d'expression des gènes BC1, B2, B1, Var1, BC2, C1 et A3 est significativement augmenté dans ce cluster.

L'analyse factorielle de données mixtes a également été réalisée pour l'expression des DC pour 50 patients (1 patients avec données manquantes) permettant d'identifier 2 principaux axes factoriels expliquant respectivement 23.6 % et 13.1% des données de la population. La clusterisation de ces patients en fonction de ces axes factoriels explicatifs a produit 3 groupes ou clusters respectivement de 36, 7 et 7 patients qui peuvent être visualisés sur le scatterplot de la figure 25.

Les clusters 1 (losange bleu), cluster 2 (triangle noir) et cluster 3 (rond rouge) figurent comme 3 populations bien distinctes avec des caractéristiques particulières pour chaque cluster.



Représentation en scatterplot des patients présents dans le cluster 1 (losange bleu), le cluster 2 (triangle noir) et le cluster 3 (rond rouge) suivant les axes 1 (23.6% des valeurs expliquées) et 2 (13.1% des valeurs expliquées). Ces axes explicatifs ont été déterminés à partir des variables âge, groupes d'exposition (R, MPG, MSG et V/E) et niveaux d'expression des DC.

Figure 25 : Scatterplot des clusters de patients suivant les axes factoriels explicatifs obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition, et des niveaux d'expression des DC.

Les caractéristiques avec l'importance de chaque variable quantitative et catégorielle sont représentées pour chaque cluster dans le tableau 12.

Description des clusters DC											
Cluster 1				Cluster 2				Cluster 3			
Effectif [%] 36 [72 %]				Effectif [%] 7 [14 %]				Effectif [%] 7 [14 %]			
Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population	Variable	Test value	Groupe	Population
Variables continues: moyenne (déviation standard)				Variables continues: moyenne (déviation standard)				Variables continues: moyenne (déviation standard)			
Age	1,85	42,69 (14,75)	39,92 (16,84)	DBLα1,4	3,70	-1,12 (2,59)	-4,77 (2,79)	DBLα1,7	4,37	-0,45 (1,78)	-2,78 (1,51)
CIDRα1,6	0,54	-3,21 (3,18)	-3,37 (3,18)	DBLβ3	3,59	0,25 (0,54)	-3,51 (2,96)	CIDRα1,1	4,16	-1,48 (2,45)	-5,22 (2,54)
DBLy4/6	-0,38	-5,07 (2,43)	-4,98 (2,60)	DBLβ7/9	2,93	-2,90 (3,26)	-5,32 (2,33)	DBLβ3	3,45	0,10 (1,08)	-3,51 (2,96)
CIDRα1,4	-0,49	-8,18 (1,87)	-8,10 (1,94)	CIDRα1,1	2,29	-3,16 (2,62)	-5,22 (2,54)	DBLα2	3,33	0,04 (1,04)	-4,24 (3,63)
DBLyDC5	-0,51	-8,60 (2,76)	-8,48 (2,73)	DBLα2	1,61	-2,17 (2,87)	-4,24 (3,63)	DBLy4/6	2,61	-2,58 (3,11)	-4,98 (2,60)
DBLβ12	-2,99	-2,44 (2,69)	-1,74 (2,61)	DBLβ12	1,31	-0,53 (0,98)	-1,74 (2,61)	DBLβ12	2,56	0,62 (1,24)	-1,74 (2,61)
DBLα1,7	-3,11	-3,20 (0,94)	-2,78 (1,51)	DBLyDC5	1,11	-7,41 (3,03)	-8,48 (2,73)	DBLβ7/9	2,16	-3,53 (3,55)	-5,32 (2,33)
DBLα1,4	-3,34	-5,60 (2,06)	-4,77 (2,79)	CIDRα1,4	0,25	-7,93 (2,10)	-8,10 (1,94)	Age	0,85	45,00 (15,87)	39,92 (16,84)
DBLα2	-3,82	-5,48 (3,28)	-4,24 (3,63)	CIDRα1,6	0,09	-3,27 (2,63)	-3,37 (3,18)	DBLα1,4	0,63	-4,16 (3,42)	-4,77 (2,79)
DBLβ7/9	-3,93	-6,14 (1,06)	-5,32 (2,33)	DBLα1,7	-0,35	-2,97 (1,68)	-2,78 (1,51)	CIDRα1,4	0,39	-7,83 (2,35)	-8,10 (1,94)
CIDRα1,1	-4,98	-6,34 (1,36)	-5,22 (2,54)	DBLy4/6	-2,11	-6,92 (0,00)	-4,98 (2,60)	DBLyDC5	-0,45	-8,91 (2,35)	-8,48 (2,73)
DBLβ3	-5,44	-4,94 (2,11)	-3,51 (2,96)	Age	-3,24	20,57 (16,81)	39,92 (16,84)	CIDRα1,6	-0,79	-4,25 (3,93)	-3,37 (3,18)
Variables catégorielles: [répartition dans le groupe] %				Variables catégorielles: [répartition dans le groupe] %				Variables catégorielles: [répartition dans le groupe] %			
APS	2,86	[100,0 %] 41,7 %	30,0 %	MSG	5,17	[83,3 %] 71,4 %	12,0 %	V/E	2,88	[44,4 %] 57,1 %	18,0 %
MPG	2,41	[85,7 %] 66,7 %	56,0 %	PG	2,23	[29,4 %] 71,4 %	34,0 %	PTG	2,08	[27,8 %] 71,4 %	36,0 %
R	0,86	[85,7 %] 16,7 %	14,0 %	R	0,02	[14,3 %] 14,3 %	14,0 %	PG	-0,32	[11,8 %] 28,6 %	34,0 %
V/E	-1,20	[55,6 %] 13,9 %	18,0 %	PTG	-0,44	[11,1 %] 28,6 %	36,0 %	MPG	-0,75	[10,7 %] 42,9 %	56,0 %
PTG	-1,27	[61,1 %] 30,6 %	36,0 %	V/E	-1,32	[0,0 %] 0,0 %	18,0 %	MSG	-1,04	[0,0 %] 0,0 %	12,0 %
PG	-1,47	[58,8 %] 27,8 %	34,0 %	APS	-1,85	[0,0 %] 0,0 %	30,0 %	R	-1,14	[0,0 %] 0,0 %	14,0 %
MSG	-3,19	[16,7 %] 2,8 %	12,0 %	MPG	-2,37	[3,6 %] 14,3 %	56,0 %	APS	-1,85	[0,0 %] 0,0 %	30,0 %

Tableau représentant les clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupes d'exposition (R, MPG, MSG et V/E) et niveaux d'expression des gènes *var*. L'ordre de représentation des différentes variables quantitatives et qualitatives est fonction de la valeur du test-value dans chaque cluster. Les variables significativement différentes dans chaque cluster par rapport à la population générale sont représentées en gras sur fond orange. Les valeurs du niveau d'expression des gènes ont été transformées en $\log(10)$.

Tableau 12 : Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques des clusters de patients obtenus à partir des variables âge, groupe d'exposition et des niveaux d'expression des DC.

L'ensemble des données reprises dans le tableau 12 nous permet de faire ressortir les caractéristiques de ces 3 clusters :

- Le cluster 1 est composé majoritairement de patients plus âgés de MPG présentant un APS avec une faible proportion significative de MSG. Le niveau d'expression des DC chez ces patients est significativement diminué pour DBL β 12-DBL β 3/5, DBL α 1.7, DBL α 1.4, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, DBL β 7/9, CIDR α 1.1 et DBL β 3.
- Le cluster 2 est constitué de jeunes patients MSG présentant un PG. La proportion de MPG et de cas d'APS est significativement diminuée dans ce cluster. DBL α 1.4, DBL β 3, DBL β 7/9 et CIDR α 1.1 sont surexprimé par rapport à la population générale tandis que DBL γ 4/6 y est significativement sous exprimé.
- Le cluster 3 est représenté par les V/E présentant majoritairement un PTG. La proportion d'APS dans ce groupe est faible par rapport à la population générale. Le niveau d'expression est significativement plus élevé de ce cluster pour DBL α 1.7, CIDR α 1.1, DBL β 3, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, DBL γ 4/6, DBL β 12-DBL β 3/5 et DBL β 7/9.

L'ensemble des données obtenues à partir des clusters formés après regroupement des variables âge, origine ethnique, présentation clinique et expression des gènes *var* et DC a

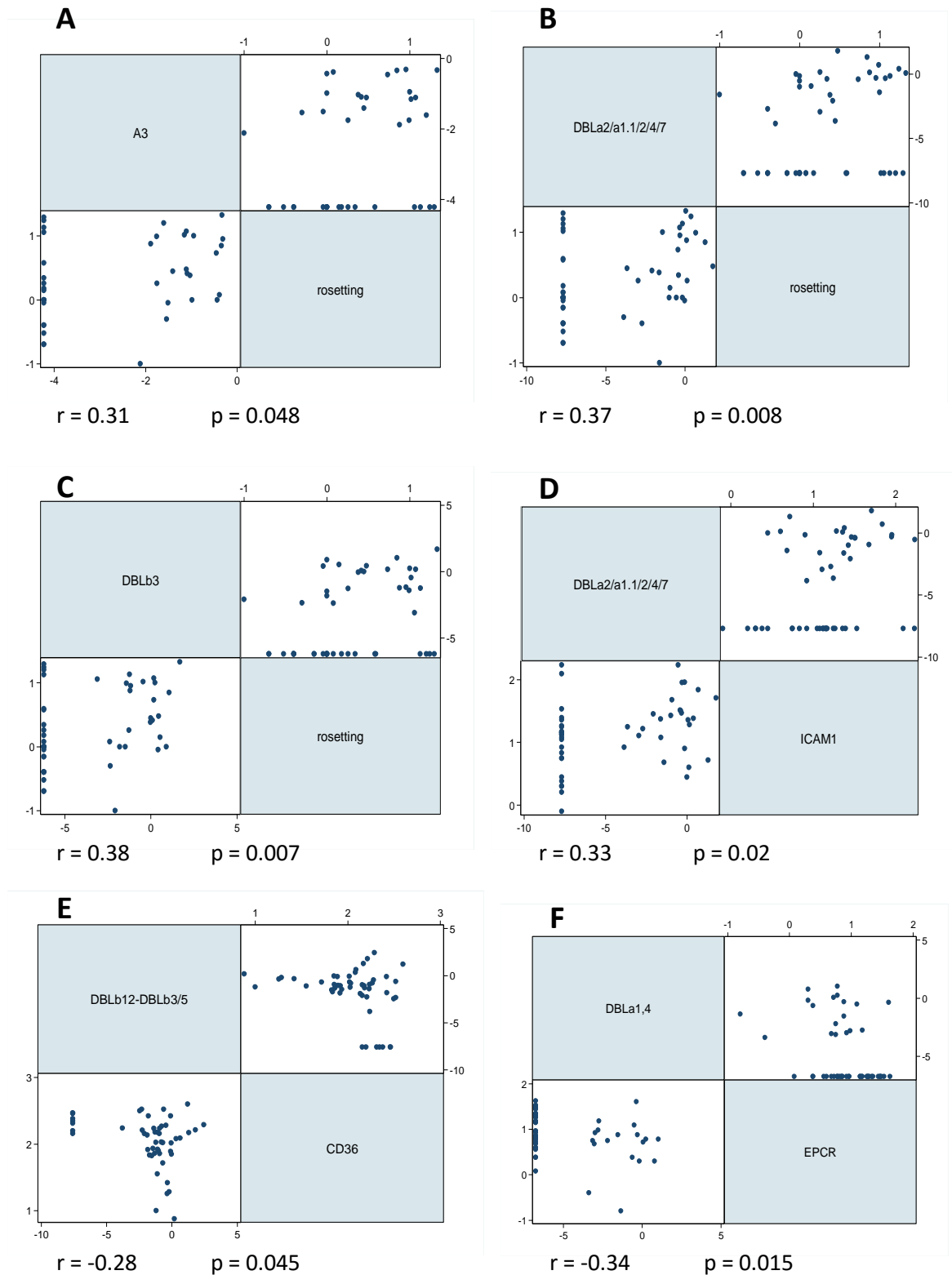
permis d'identifier des groupes à risque ou « protégé » vis-à-vis de l'accès palustre « grave » et « très grave » et d'y associer l'expression préférentielle de certains gènes.

- Groupe A = cluster 1 des gènes *var* (C1var): groupe de patients hétérogènes présentant un PG.
- Groupe B = cluster 2 des gènes *var* (C2var) : groupe de jeunes patients à risque de présenter un PG.
- Groupe C = cluster 3 des gènes *var* (C3var) : groupe de patients présentant un APS.
- Groupe D = cluster 4 de *var* (C4var) : groupe de patients à risque de PTG.
- Groupe E = cluster 1 de DC (C1DC) : groupe de patients présentant un APS.
- Groupe F = cluster 2 de DC (C2DC) : groupe de patients à risque de présenter un PG.
- Groupe G = cluster 3 de DC (C3DC) : groupe de patients à risque de PTG

Ces groupes d'individus mettaient en évidence une surexpression significative ou une augmentation non significative de l'expression des gènes A1, A3, B1, B2, BC1, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, CIDR α 1.1, DBL α 1.4, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL α 1.7, DBL γ 4/6, DBL β 7/9 et DBL β 3 dans le paludisme « grave » et le paludisme « très grave » d'importation.

Relation entre le niveau d'expression des gènes et le phénotype de cytoadhérence

Les données du phénotypage de cytoadhérence ainsi que les niveaux d'expression mesurés pour les groupes de gènes *var* et DC reconnus comme impliqués dans l'accès palustre « grave » et « très grave » lors de cette étude ont été mis en relation et des corrélations positives ont été mises en évidence notamment entre l'expression du groupe de gènes A3 et le *rosetting* ($p = 0.048$; $r = 0.31$), DBL α 2/ α 1.1/2/4/7 et le *rosetting* ($r=0.37$; $p = 0.008$) et DBL β 3 et le *rosetting* ($r = 0.38$; $p = 0.007$). L'augmentation du niveau d'expression de DBL α 2/ α 1.1/2/4/7 était également corrélée avec une augmentation de la cytoadhérence sur ICAM-1 ($r = 0.33$; $p = 0.02$). Des corrélations négatives ont également été mises en évidence entre DBL β 12-DBL β 3/5 et CD36 ($r = -0.28$; $p = 0.045$) et entre DBL α 1.4 et EPCR ($r = -0.34$; $p = 0.015$) (figure 27a-f). Le groupe A3 et les domaines cassettes DC8 et DC4, via leur régions protéiques respectives DBL α 2 et DBL β 3, favorisent le phénomène de *rosetting* à l'origine de la survenue d'un accès « très grave » dans le cadre du paludisme d'importation.



Corrélation de Spearman entre le phénotype de cytoadhérence et le profil d'expression des gènes *var* et DC. Les niveaux d'expression des gènes, le nombre de globules rouges cytoadhérents et la fréquence de *rosetting* ont été transformés en $\log(10)$ pour l'analyse. r correspond au coefficient de corrélation. Le seuil de significativité est fixé à p value < 0.05.

Figure 27 : Relation entre le niveau d'expression d'A3, DBLa2/a10.1/2/4/7, DBLβ3, DBLβ12-DBLβ3/5 et DBLa1.4 avec le rosetting (A, B, C), ICAM-1 (D), CD36 (E) et EPCR (F).

Discussion

Cette étude qui a inclus 51 isolats d'accès palustres d'importation, a permis de montrer que le phénomène de *rosetting* est le mécanisme de cytoadhérence impliqué dans l'accès palustre « très grave » dans le cadre du paludisme d'importation. Premièrement, ce phénotype a été retrouvé à la limite de significativité lors de la comparaison de fréquence de *rosetting* entre PTG et APS ($p = 0.06$). Deuxièmement, il représente le mécanisme de séquestration le plus fréquemment observé chez les voyageurs considérés à risque de développer une forme grave de l'infection par rapport aux autres groupes de patients exposés ($p = 0.01$ et $p = 0.02$ respectivement pour V/E vs. MPG et V/E vs. R). Troisièmement, il est confirmé comme le seul facteur de risque de la survenue d'un accès palustre « très grave » dans l'étude multivariée par rapport aux autres phénotypes de cytoadhérence, et de plus la diminution du pourcentage de *rosetting* a été montrée par la régression logistique avec les MPG et MSG, associée à une diminution du risque de PTG. Ce phénomène de *rosetting* a été reconnu comme un des principaux facteurs de risque de l'atteinte neurologique chez les enfants en zone d'endémie du fait de l'observation d'un fort pourcentage de *rosetting* avec les isolats prélevés chez ces patients [67], [93], [100], [102] et par une diminution de la fréquence des formes neurologiques chez les patients possédant un taux élevé d'anticorps anti-*rosetting* [188].

A notre connaissance, aucune donnée de cytoadhérence n'est publiée chez les populations à risque de développer des formes graves de l'infection palustre dans le cadre du paludisme d'importation. L'étude présentée est la première à mettre en évidence ce phénotype de *rosetting* chez des adultes de différentes origines ethniques avec des antécédents d'exposition variable au parasite. Néanmoins, la classification des accès palustres de cette étude selon les 3 groupes cliniques de PTG, PG et APS ne nous a pas permis d'individualiser un tableau clinique dans lequel serait impliqué le *rosetting*, du fait du mélange d'accès clinique et de

groupes d'exposition, mais il semblerait que le *rosetting* soit préférentiellement associé au neuropaludisme. Cependant, une diminution de la fréquence de *rosetting* n'est pas synonyme de protection vis-à-vis de l'accès palustre « très grave » et démontre que ce phénomène n'est pas le seul phénotype impliqué, notamment chez les patients résidents qui présentent des formes « très graves » de type « état de choc » sans atteinte cérébrale avec un faible pourcentage de *rosetting*. Cette observation corrobore notre hypothèse de départ sur la potentielle « immunisation » rapide du groupe de patients résidents vis-à-vis de certains groupes antigéniques [161], [168], [170], [171], [173]–[175], [186] qui seraient probablement en rapport avec le *rosetting* et seraient alors inhibé par les anticorps lors du développement du parasite chez l'hôte immunisé. Mais, cette protection ne serait pas suffisante contre toutes les formes graves et le « gap » dans le répertoire anticorps du patient exposé favoriserait l'expression d'autres groupes de gènes et donc d'autres PfEMP1 associées à cette présentation clinique [106], [172]. L'étude de l'expression des gènes *var* et DC ainsi que le phénotype de cytoadhérence associé réalisée sur un effectif limité de MPG et R n'a pas permis d'apporter des éléments pour expliquer les mécanismes physiopathologiques de ce type d'accès « très grave » non cérébral dans le cadre du paludisme d'importation et devrait être complétée par une étude sur un effectif plus grand.

Le phénomène de *rosetting* est associé à la liaison de globules rouges parasités avec des globules rouges non parasités via différents récepteurs identifiés tels que le récepteur du complément CR1 [68], [93], les antigènes de surface des groupes sanguins A et B et les glycoaminoglycanes avec l'héparine ou l'héparane sulfate [89], [93], [209]–[213] qui interagissent avec PfEMP1 [209] caractérisant ainsi les nombreux phénotypes différents de *rosetting*. L'implication de ces phénotypes de *rosetting* dans l'accès palustre grave est variable, comme cela a été mis en évidence par une absence de relation entre la fréquence de *rosetting* évaluée et certains tableaux cliniques de gravité tels que la détresse respiratoire et le

neuropaludisme [214]. Par ailleurs, il a été montré que, du point de vue génomique, certains profils d'Homology Block associés au *rosetting* ne provoquent pas d'atteintes neurologiques mais des tableaux pulmonaires [122]. Une étude serait nécessaire pour identifier les récepteurs des GR impliqués dans les phénomènes de *rosetting* en relation avec les différents tableaux cliniques dans la population du paludisme d'importation.

La séquestration parasitaire qui reste à l'heure actuelle le mécanisme physiopathologique considéré comme prépondérant dans la survenue d'un accès palustre grave repose sur l'interaction entre des récepteurs de l'hôte situés à la surface des cellules et la protéine parasitaire PfEMP1 exposée à la surface du globule rouge parasité [67], [72], [75], [76], [102]. Chez l'hôte, de nombreux récepteurs ont été décrits dans ces interactions hôte-parasites [68], [85], [90] dont certains seraient particulièrement impliqués dans la cytoadhérence des globules rouges parasités à l'origine de l'atteinte neurologique chez les enfants en zone d'endémie. C'est notamment le cas de CD36 [85]–[88], [90], ICAM-1 [86], [87], [90], EPCR [91], [140].

En accord avec les données de la littérature sur ces mêmes récepteurs (CD36, ICAM-1, EPCR) [88], [215], [216], nos résultats ont montré que le nombre de globules rouges parasités cytoadhérents sur les récepteurs testés est plus élevé chez les populations à risque de développer un PG et PTG représentées ici par les voyageurs/expatriés. Cette observation est probablement liée à une proportion de knobs plus importante à la surface des globules rouges parasités [71] lui permettant d'exprimer un phénotype de cytoadhérence multiple envers de nombreux récepteurs de l'hôte [215], [216]. La présence de plusieurs clones de *Plasmodium falciparum* avec des phénotypes différents dans un même isolat peut également être à l'origine de ce phénomène [215], [216].

Malgré ces observations, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les différents phénotypes en fonction de la présentation clinique et du groupe d'exposition. Une différence à la limite de la significativité est néanmoins observée pour la cytoadhérence sur CD36 avec les isolats des MPG, R et V/E qui sont les populations les plus âgées et pour lesquelles la probabilité de développer un APS est plus élevée mais où le risque de PG et PTG n'est pas négligeable. Cette hypothèse ambiguë est toutefois en accord avec les données antérieures qui ont mis en évidence dans certaines études une augmentation de la cytoadhérence à ce récepteur dans les atteintes cérébrales chez l'enfant [88] tandis que d'autres études associent la cytoadhérence à CD36 avec l'accès palustre simple [86], [90]. L'absence de différences entre les groupes pour le récepteur ICAM-1, même si celui-ci est impliqué dans le neuropaludisme [87], n'est cependant pas discordante avec certaines études. En effet, une variation de la cytoadhérence à ce récepteur a été décrite, liée à son polymorphisme dans certaines populations où à la méthodologie de cytoadhérence utilisée dans l'étude qui repose sur une évaluation de la cytoadhérence sur récepteurs solubles en mode statique qui diffère des études en flux ou sur cellules transfectées exprimant un CD36 natif [86]–[88], [90].

L'EPCR est le dernier récepteur décrit dans le paludisme « très grave » à l'origine de l'atteinte neurologique par son interaction avec le motif CIDR α 1 de DC8 ou DC13 [91], [92], [140], [206]. Cette manifestation cérébrale serait liée à la perte des récepteurs EPCR à la surface des cellules endothéliales, et à la fixation des GR parasités à EPCR bloquant l'activation de la protéine C ce qui provoque un déséquilibre du métabolisme de la coagulation et un processus inflammatoire important [217], [218]. La forme soluble d'EPCR, soumise à la variabilité de son gène humain PROPCR, semble être le reflet de l'atteinte neurologique et serait considérée comme un facteur de protection de la séquestration sur EPCR [141], [219], [220].

Peu d'études ont été menées sur la cytoadhérence d'isolats cliniques de *P. falciparum* sur EPCR ne permettant pas une comparaison de nos données qui ne montrent aucune différence de cytoadhérence sur EPCR quelque soit les patients considérés. Cette très faible adhérence des isolats peut être liée à des problèmes méthodologiques comme l'utilisation de récepteurs solubles pour ces essais au lieu d'antigènes natifs, d'une concentration non optimisée en récepteurs ou de l'utilisation d'une méthode statique sur boîte qui peut modifier la conformation du récepteur rendant son site de liaison moins accessible à PfEMP1. A l'inverse, on ne peut exclure que la cytoadhérence à EPCR n'est pas le mécanisme prépondérant de la survenue du paludisme « très grave » dans le cadre du paludisme d'importation et cela pour plusieurs raisons. En effet, la cytoadhérence à EPCR est impliquée au départ dans le neuropaludisme chez l'enfant ce qui représente dans notre population une minorité de patients. En revanche, le manque de puissance de notre étude par le faible effectif ainsi que la potentielle non implication d'EPCR dans les autres formes « très graves » de paludisme ou chez les adultes ne nous permet peut être pas de mettre en évidence ce phénotype dans ce groupe de patients adultes avec du paludisme grave sans atteinte cérébrale [221]. Une étude ciblée de ce phénotype de cytoadhérence dans une population d'enfants présentant une atteinte neurologique dans le cadre du paludisme d'importation est nécessaire pour valider à cette hypothèse. L'atteinte neurologique chez l'enfant serait la conséquence de la conjugaison entre un déséquilibre de la coagulation et une réaction inflammatoire, or ces mécanismes physiopathologiques n'ont pas été validés chez l'adulte et ne sont peut être pas à l'origine du neuropaludisme chez l'adulte qui représente la majorité de nos patients [221]. Enfin, la cytoadhérence ne représente peut être qu'un mécanisme minoritaire dans la survenue de l'accès palustre « très grave » qui doit être associé à un ou plusieurs autres phénotypes de cytoadhérence comme cela a déjà pu être décrit lors d'études *in vitro* mais aucun argument sur l'existence d'un phénotype multiple de cytoadhérence n'est disponible *in vivo* [99], [100].

Un sous groupe de gène *var* A et B/A, préférentiellement exprimés lors d'un accès palustre grave [112], [114]–[116], coderait pour des protéines PfEMP1 aux régions semi-conservées [77] contenant des domaines cassettes, dont le phénotype d'adhérence entraînerait une obstruction de la microcirculation des organes profonds notamment pour DC4, DC5, DC8 et DC13 [78]–[83].

L'étude antérieure sur le profil d'expression des gènes *var* et des domaines cassettes a démontré la surexpression d'A1, A2, A3, B1, BC1, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, CIDR α 1.1, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL α 1.7 et DBL β 7/9 dans les formes « graves » et « très graves » de l'infection à *Plasmodium falciparum*. Après avoir déterminé les phénotypes d'adhérence des isolats cliniques de *P. falciparum* prélevés dans le cadre du paludisme d'importation, nous avons cherché à corréliser ces phénotypes au profil d'expression des gènes *var* et DC.

Le profil d'expression des gènes *var* et des domaines cassettes dans la population d'étude de ce travail est quasi similaire à celui observé dans notre étude précédente malgré une étape supplémentaire de maturation des formes parasitaires. Cependant, bien qu'un temps de maturation < 48 heures pour limiter la variation d'expression des gènes en culture ait été respecté [208], une diminution significative du niveau d'expression d'A3, B2, BC2, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL β 3 et DBL γ DC5 a été observée. Ces gènes ont déjà été identifiés dans l'étude précédente comme associés à des formes palustres graves (A3, B2, BC2, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL β 3) ou des formes simples (DBL γ DC5) ; ces tendances ont été retrouvées dans l'étude sur un autre groupe d'isolats confirmant que la variation de leur expression au cours de la phase de maturation *in vitro* ne modifie pas l'interprétation de l'expression des gènes.

La surexpression des gènes A1, A3, B1, B2, BC1, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, CIDR α 1.1, DBL α 1.4, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL α 1.7, DBL γ 4/6, DBL β 7/9 et DBL β 3 dans le paludisme « grave » et le paludisme « très grave » d'importation confirme nos précédents travaux. Les gènes A, B, DC4, DC5, DC8 et DC13 sont présents à un niveau d'expression plus élevé dans cette

population hétérogène ce qui permet d'aboutir aux mêmes conclusions sur la potentielle expression non aléatoire des gènes *var* et DC chez les patients à risque de développer un accès palustre grave.

La corrélation observée entre le phénotype de cytoadhérence et l'expression des gènes *var* et DC confirme la relation existante et identifiée entre les gènes du groupe A et le *rosetting* mais révèle pour la première fois un phénotype de *rosetting* associé aux DC8 et DC4 via respectivement leur motif protéique DBL α 2 et DBL β 3 ainsi qu'une relation en faveur de la cytoadhérence du motif DBL α 2 sur ICAM-1. Ces résultats ajoutent des arguments en faveur d'une participation active de DC8 et DC4 dans le paludisme « très grave » dans un contexte de paludisme d'importation. La corrélation négative entre DBL β 12-DBL β 3/5 et CD36, récepteur décrit dans les formes simples, va également dans le sens d'une association entre DC8 ainsi que DC4 et la gravité de l'infection palustre. La corrélation négative entre DBL α 4, surexprimé dans le PG et PTG, et EPCR signale qu'il existe probablement un autre mécanisme d'action qu'EPCR dans la survenue d'un paludisme grave pour DC4.

Le motif DBL α 1 est un domaine protéique de structure semi-conservée largement décrit dans la littérature comme le principal ligand des récepteurs CR1, GAG et des antigènes de groupe sanguin A et B impliqués dans le *rosetting* [209]–[213], [222], [223] ainsi qu'un antigène de choix pour le développement de l'immunité anti-palustre [126]–[128], [169], [189], [190], [224], [225]. Les très nombreuses études menées sur les séquences de ce motif ont révélé une association entre la composition de cette séquence de DBL α 1 et le groupe de gènes *var* apparenté ainsi qu'avec sa capacité à former des rosettes notamment pour les séquences délétées pour 1 à 2 résidus cystéines [94]–[96], [117], [121]. L'identification d'un domaine DBL α conservé au sein de la cassette DC8 et corrélé au *rosetting*, et pour la première fois à la cytoadhérence à ICAM-1 et au PTG, renforce l'intérêt pour ce domaine protéique et plus généralement pour DC8 en tant que potentiel cible thérapeutique [226] ou

candidat vaccin. La poursuite de la description de ces séquences protéiques DBL α -DC8 est nécessaire afin de déterminer des séquences conservées dans ce domaine protéique et d'identifier les sites d'interaction et ligands potentiels en vue de développer des thérapeutiques spécifiques est justifiée.

Le recrutement des isolats pour cette étude de phénotypage s'est déroulé de manière prospective, l'objectif étant d'obtenir des groupes définis par la présentation clinique de l'accès palustre de taille équivalente pour l'analyse statistique. Ce mode de recrutement associé à une sélection involontaire des isolats de *Plasmodium falciparum* dont la maturation en culture était variable, a probablement introduit un biais de sélection. Cette hypothèse est étayée par une distribution différente de nos groupes de patients exposés dans cette étude par rapport aux études précédentes ainsi que par l'absence de variation dans la numérotation des plaquettes entre les groupes cliniques considérée comme un marqueur de gravité [52].

La majorité des patients recrutés présentaient un tableau de PG ou de PTG quelque soit l'origine ethnique des patients, répartition qui n'avait pas été observée pour l'instant dans les 2 précédents travaux présentés. Néanmoins, même si les PG et PTG représentaient 51 % des cas chez les MPG, ce groupe d'exposition demeure le plus « protégé » contre l'accès palustre grave contrairement aux groupes MSG et V/E qui présentaient dans cette étude respectivement une proportion cumulée de PG et PTG de 83 et 89%. Ces tendances de répartition sont considérées comme concordantes avec les données de nos populations de paludisme d'importation antérieures. La totalité des patients résidents en zone d'endémie dans notre groupe d'étude présentent un tableau de paludisme « très grave » caractérisé dans 87 % des cas par des atteintes non cérébrales. Cette répartition atypique de PTG dans ce groupe de patients dont la moyenne d'âge est de 28 ans, est probablement liée à leur pré-exposition intense au parasite dès leur plus jeune âge en zone d'endémie leur conférant une potentielle semi-immunité précoce contre les formes neurologiques de la maladie associées à un groupe

restreint de gènes *var* et de protéines PfEMP1 semi-conservées [161], [168], [170], [171], [173]–[175], [186]. Enfin, l'âge élevé reste dans cette population une variable plus fréquemment retrouvée dans les groupes à risque de PTG comme cela avait déjà été observé dans les travaux antérieurs et sur d'autres populations d'études dans le cadre du paludisme d'importation [199]. Les observations faites pour ce groupe d'étude montrent une fois encore que l'âge élevé et le groupe de patients exposés peuvent avoir une influence sur la présentation clinique de l'accès palustre d'importation comme cela avait déjà été mis en évidence dans les 2 précédents travaux rendant ces populations comparables entre ces études.

Au total, un double phénotype de cytoadhérence a été mis en évidence pour la première fois pour les motifs protéiques DBL α 2 et DBL β 3 suite à leur corrélation respectivement avec ICAM-1 et le *rosetting*. Le domaine protéique DBL β dont fait partie DBL β 3 de DC4 est au départ un site d'interaction pour ICAM-1. DBL α est le principal ligand associé au *rosetting* et n'a jamais été décrit dans des interactions avec ICAM-1. Ces résultats doivent être confirmés par des études de séquences et lors d'études *in vitro*. L'existence d'un double phénotype de cytoadhérence sur le même domaine protéique est une hypothèse qui n'a jamais été explorée et qui pourrait expliquer l'existence suggérée de phénotypes d'adhérence multiples observés lors des cas de paludisme « grave » et « très grave » et mis en évidence lors d'études *in vitro* sur des souches de *Plasmodium falciparum* [99], [100]. De récents travaux ont également observées que DC8 et DC13 avaient la capacité de cytoadhérer à de nombreux types de cellules endothéliales ce qui pourrait être expliqué par des phénotypes multiples d'adhésion aux récepteurs des cellules endothéliales [227]. L'hypothèse d'une similarité de séquences au niveau des sites d'interaction de ces domaines protéiques pourrait également expliquer l'acquisition rapide d'une immunité transversale après un accès palustre grave.

L'ensemble des observations faites dans notre population doit être confirmé par d'autres études plus puissantes incluant un nombre de patients plus important dans un contexte clinique précisément défini pour corréler ces observations avec un tableau clinique particulier.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le paludisme à *Plasmodium falciparum* est un problème de santé publique mondial exposant 3.3 milliards de personnes au risque d'infection et responsable de centaines de milliers de morts par an notamment chez les enfants de moins de cinq ans en zone d'endémie [1]. Ce fléau parasitaire n'est pas seulement un problème en zones intertropicales car les pays devenus non endémiques pour le paludisme restent toujours exposés à ce risque infectieux par les échanges commerciaux et le tourisme qui se développent de plus en plus entre ces régions [2]. Les pays d'Europe occidentale et notamment la France, premier pays exposé en Europe avec environ 4100 cas de paludisme d'importation annuels en 2013 dont 87% d'infection à *Plasmodium falciparum*, originaire dans 96% des cas d'Afrique subsaharienne [4], sont particulièrement exposés à ce risque posant de réels problèmes de diagnostic et de prise en charge de ces patients [3], [6], [7], [30]. En 2013, 10 décès directement reliés à l'accès palustre par *Plasmodium falciparum* ont été recensés [4].

C'est dans ce contexte épidémiologique que le centre national de référence du paludisme en France, via un réseau composé de 80 correspondants hospitaliers, a entre autres pour mission la surveillance, de manière prospective, du nombre de cas de paludisme d'importation diagnostiqués en France métropolitaine et l'apport d'une expertise biologique à partir des prélèvements ayant permis le diagnostic dans les différents centres hospitaliers correspondants.

Le paludisme d'importation à *Plasmodium falciparum* touche une population hétérogène de patients dont les principales catégories sont les migrants de première génération, les migrants de deuxième génération, les voyageurs, les expatriés de retour de zones d'endémie et les résidents de zone d'endémie en voyage en France. Toutes les tranches d'âge peuvent être atteintes dans le paludisme d'importation. De même, les antécédents des patients (« l'histoire ») vis-à-vis de *Plasmodium falciparum* est très variable selon les cas, conférant pour certains une probable « protection » contre certaines formes cliniques [176], [177], [228]

même si les données peuvent être contradictoires selon les populations [15]. L'accès palustre grave d'importation à *Plasmodium falciparum* représentait 12% des cas notifiés en France métropolitaine en 2013 [4]. Contrairement aux formes palustres décrites en zone d'endémie en Afrique subsaharienne caractérisées majoritairement par une anémie sévère et une atteinte cérébral ou neuropaludisme chez les enfants de moins de cinq ans, le paludisme grave d'importation se présentent sous des formes cliniques variées qui peuvent être plus ou moins associées à un risque élevé de mortalité [23]–[27].

De nombreuses études épidémiologiques effectuées dans le cadre du paludisme d'importation ont permis d'identifier des facteurs de risque associés à la survenue d'un accès palustre grave [5]–[7] mais il n'existe à l'heure actuelle que très peu de données biologiques et quasiment aucune investigation des mécanismes physiopathologiques de l'accès grave menée dans le cadre du paludisme d'importation. La grande partie des résultats publiés portant sur les interactions hôte-parasite et les mécanismes physiopathologiques associés sont issus d'études réalisées sur des populations d'enfants âgés de moins de cinq ans, résidant dans des zones rurales en zone hyper endémique d'Afrique subsaharienne ou dans des régions endémiques instables comme en Papouasie-Nouvelle-Guinée, soumis à une exposition plus ou moins permanente au risque palustre et potentiellement exposés à d'autres risques infectieux. L'ensemble de ces caractéristiques rend parfois difficile la transposition des résultats générés dans ces zones avec les populations rencontrées dans le contexte du paludisme d'importation limitant ainsi la compréhension des phénomènes observés dans ce cadre.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce projet de thèse dont le principal objectif était l'analyse de facteurs d'hôte et de facteurs parasitaires dans le paludisme grave d'importation. La principale difficulté de ce travail était au départ de recruter, via les isolats inclus, des groupes de patients qui soient représentatifs des populations rencontrées dans la cadre du paludisme d'importation. Le réseau de correspondants du CNR paludisme grâce à qui le

recrutement des échantillons a été réalisé, a permis en partie de pallier à ce problème. Avec une représentativité de 52.4% des cas diagnostiqués en France métropolitaine en 2013, ce réseau de surveillance reflète les tendances observées dans les populations de voyageurs visitant des zones d'endémie. D'autre part, comme évoqué ci-dessus, les populations de patients dans le contexte du paludisme d'importation sont très hétérogènes par rapport aux populations étudiées en zone d'endémie, particulièrement en Afrique subsaharienne, nous obligeant à établir une classification pertinente et précise des patients et des présentations cliniques observées afin de faire ressortir les potentielles différences significatives entre les groupes.

Ces travaux de thèse se sont articulés autour de trois grands thèmes. La première partie de mes travaux a consisté à identifier des facteurs de risque associés à la survenue de l'accès palustre « très grave » dans le cadre du paludisme d'importation en prenant en compte pour la première fois, au plus des données épidémiologiques et cliniques, le statut sérologique des patients et en utilisant de nouveaux marqueurs de sévérité de l'infection palustre que sont le dosage plasmatique de la protéine parasitaire HRP2 et l'estimation des biomasses totales, circulantes et séquestrées parasitaires. A travers une reclassification parmi les accès palustres graves définis par le score de l'OMS de 2000 [20], et modulé par les recommandations françaises de prise en charge du paludisme d'importation en France métropolitaine [21], cette première partie de la thèse avait pour objectif de valider cette classification clinique par l'utilisation de ces données biologiques associées à la survenue de l'accès palustre « très grave » en zone d'endémie [56]–[58]. Cette analyse a ainsi permis dans un premier temps de confirmer certains facteurs de risque déjà identifiés dans les formes de paludisme grave fortement associées à la mortalité. Ainsi, l'âge élevé des patients [163], [199], l'origine ethnique [5]–[7], [25], [27], le délai de prise en charge [6], [7], l'absence d'antécédents de paludisme [5] et la profondeur de la thrombopénie [52] apparaissent aussi dans notre

population comme des facteurs de risque d'accès palustre « très grave » lié à l'atteinte d'organes profonds et à l'état de choc. Ce sous groupe clinique de paludisme « très grave » a également été caractérisé par une biomasse parasitaire séquestrée élevée qui confirme que le tableau clinique et biologique que nous avons défini comme le paludisme « très grave » constitue véritablement une entité clinique à part entière avec un mécanisme physiopathologique significativement différent du paludisme « grave » et du paludisme simple définis selon nos critères, associée à une quantité très élevée de formes parasitaires séquestrées dans la microcirculation. Ce groupe clinique constitue donc un groupe d'intérêt pour des études ultérieures sur les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les formes « très graves » du paludisme d'importation.

Comme suggérée dans des travaux antérieurs publiés [176], [177], [228], nous avons émis l'hypothèse d'une « protection à long terme » vis-à-vis de l'accès palustre « très grave », d'acquisition rapide quel que soit l'âge des voyageurs et découlant d'une pré-exposition à *Plasmodium falciparum* afin d'expliquer les différences observées entre les sous groupes cliniques. Même si les données épidémiologiques et cliniques semblent corroborer cette hypothèse, la détection et la quantification des anticorps totaux dirigés contre *P. falciparum* constitue une bonne méthode pour évaluer l'exposition antérieure du patient au parasite mais ne constitue pas, comme le confirment nos résultats, le reflet d'une « protection immunologique » vis-à-vis des formes « très graves » de l'infection palustre à *Plasmodium falciparum*. La nécessité d'un meilleur outil biologique capable de déterminer chez un patient un statut de « protection » ou « à risque » de paludisme « très grave » a été mise en évidence et doit être investiguée dans cette population de patients dans l'hypothèse d'une acquisition séquentielle d'une protection immunologique humorale contre la séquestration parasitaire, impliquée dans les formes « graves » et les formes « très graves » de l'infection palustre, chez

le voyageur, et probablement, chez les populations vivants en zone d'endémie où la prévalence du paludisme diminue.

Ce premier travail a présenté des limites dans l'étude du paludisme d'importation. Le nombre de marqueurs biologiques étudiés lors de cette étude et les critères d'inclusions choisis ont limité le recrutement de certains patients en raison d'un volume de prélèvement insuffisant, et notamment les jeunes enfants présentant un paludisme d'importation ainsi que certaines formes graves qui sont par conséquent sous représentées dans notre population de patients. Des études complémentaires seraient donc à effectuer chez les enfants principalement ou pour certaines catégories cliniques pour confirmer nos observations.

A partir de ces premières observations, la deuxième partie des travaux s'est focalisée sur l'étude du profil d'expression des gènes *var* et des DC, respectant les mêmes classifications cliniques et épidémiologiques que dans la première partie, afin de compléter les données épidémiologiques, cliniques et sérologiques avec des résultats de transcriptomique. L'objectif était d'identifier une expression de gènes ou de groupes de gènes corrélée avec l'apparition d'un paludisme « grave » ou « très grave » d'importation. L'étude de l'expression des gènes *var* et de certains DC incriminés dans les formes graves de l'infection palustre a été menée en fonction des principaux facteurs de risque identifiés dans l'étude précédente que sont l'âge, l'origine ethnique des patients et leur statut sérologique.

Pour la première fois dans une population de paludisme d'importation, il a pu être mis en évidence une correspondance entre la présentation clinique de l'accès palustre grave et l'expression de certains groupes de gènes *var* et DC. La surexpression des gènes ou groupes de gènes A1, A2, A3, B1, B2, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, CIDR α 1.1, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL α 1.7, DBL γ 4/6, DBL α 1.4 et DBL β 3 identifiée dans ce travail pour les groupes cliniques de paludisme « grave » et de paludisme « très grave » est en accord avec les résultats d'études

réalisées chez des enfants présentant un neuropaludisme en zone d'endémie et chez lesquels une surexpression des groupes A, B et des DC8 et DC13 avait été mis en évidence [82], [83], [112], [113], [116], [118].

Ces résultats permettent de décrire, dans une autre population hétérogène à risque de développer un accès palustre « très grave » aux caractéristiques épidémiologiques, démographiques, cliniques et immunologiques différentes des enfants de moins de cinq ans en zone d'endémie, une surexpression d'un groupe restreints de gènes *var* et de DC déjà retrouvée dans les populations précédemment étudiées de zone d'endémie. Les protéines PfEMP1 codées par ce groupe de gènes *var* et contenant ces DC peuvent être considérées comme de potentiels antigènes candidats pour une thérapie vaccinale des formes graves de paludisme. Néanmoins, ces résultats ne représentent qu'une image partielle du transcriptome des gènes *var* dans cette population de paludisme d'importation. Le nombre relativement restreint de patients inclus dans cette deuxième étude (151 patients) ainsi que le design de l'étude moins robuste du point de vue statistique qu'une étude de cohorte ou qu'une étude cas-témoin, ne permet pas clairement d'identifier une surexpression significative d'un groupe particulier de gènes dans un groupe clinique précis. Le choix des DC pour cette étude, basé sur des données de la littérature, limite également l'analyse de ce transcriptome au risque de ne pas identifier un groupe de DC d'intérêt. Des études plus conséquentes avec une méthodologie différente pourraient être réalisées dans cette population afin de confirmer ces résultats préalables. De plus, nos sous groupes cliniques rassemblent des atteintes cliniques différentes (atteinte rénale, hépatique, pulmonaire,..) avec un profil d'expression des gènes *var* et DC qui leur sont probablement propres. Des investigations plus poussées dans chacun de ces sous groupes cliniques tel que l'état de choc, l'insuffisance rénale aigue ou la détresse respiratoire, apporteraient des informations supplémentaires sur la complexe interaction entre

le parasite et l'hôte au niveau de l'expression des gènes *var* et de la présentation clinique associée chez l'hôte.

La séquestration parasitaire, via les protéines PfEMP1 codées par les gènes *var*, est le principal mécanisme physiopathologique impliqué dans la survenue de l'accès palustre. Alors que de nombreux récepteurs de l'hôte ont été identifiés comme intervenant dans l'accès palustre grave en zone d'endémie, aucune donnée de cytoadhérence n'est disponible pour l'accès grave dans le cadre du paludisme d'importation. La troisième partie de ces travaux de thèse s'est tournée vers l'étude du phénotype d'adhérence d'un sous-groupe d'isolats cliniques de *Plasmodium falciparum* et sur la corrélation entre le phénotype de cytoadhérence observé et le profil d'expression des gènes *var* et DC dans cette même population.

Les résultats obtenus montrent que le phénomène de *rosetting* est le principal mécanisme de cytoadhérence impliqué dans la survenue de l'accès palustre « très grave » chez les populations de voyageurs. Ces observations, conformes à ce qui a pu être décrit chez les enfants de moins de 5 ans en zone d'endémie [93], s'appuient dans le paludisme d'importation sur une fréquence plus élevée de *rosetting* chez les patients présentant un accès palustre « très grave » et confirmé par la suite comme le seul facteur de risque de l'accès palustre « très grave » par rapport aux autres phénotypes de cytoadhérence. La diminution de la fréquence de *rosetting* chez les MSG et les MPG est également associée à une protection de ces populations vis-à-vis de ces formes graves. Néanmoins, ce phénomène de *rosetting* n'explique pas l'ensemble des cas de paludisme « très grave » observés dans le paludisme d'importation et l'absence de différences que ce soient entre les groupes cliniques ou entre les groupes de patients exposés en ce qui concerne l'adhérence aux récepteurs CD36, ICAM-1 et EPCR, laisse présager que les mécanismes physiopathologiques sont différents entre les enfants en zone d'endémie et les adultes dans le contexte de paludisme d'importation ou qu'il

existe d'autres phénotypes impliqués dans le paludisme grave qui n'ont peut être pas été testés dans cette étude ou pas encore décrits dans les populations à risque.

Le profil d'expression des gènes *var* et DC analysé après maturation *in vitro* des parasites des isolats cliniques de *Plasmodium falciparum*, responsable d'accès de paludisme d'importation, confirme nos résultats précédents avec la surexpression des gènes A1, A3, B1, B2, BC1, DBL α 2/ α 1.1/2/4/7, CIDR α 1.1, DBL α 1.4, DBL β 12-DBL β 3/5, DBL α 1.7, DBL γ 4/6, DBL β 7/9 et DBL β 3 associée au paludisme grave. La corrélation entre le phénotype de cytoadhérence observé et le profil d'expression de ces gènes a été confirmé entre DBL α 2 et DBL β 3 avec le phénotype de *rosetting* ce qui correspond à la première description d'un phénotype de *rosetting* pour DC8 et DC4 qui au départ avaient été identifiés comme les ligands préférentiels d'EPCR et d'ICAM-1 *in vitro*. Cette implication de DC8 et DC4 dans ce phénomène de *rosetting* très fortement associé au paludisme « très grave » d'importation apporte encore un élément supplémentaire à la prédominance de ces domaines cassettes DC8 et DC4 dans les formes graves de l'accès palustre avec un fort taux de mortalité confirmant l'intérêt à porter à ces domaines protéiques comme protéines candidats vaccins vis-à-vis des formes graves de paludisme. Les deux phénotypes (ICAM-1/*rosetting* pour DC4 et EPCR/*rosetting*/ICAM-1 pour DC8) qui semblent être associés à ces domaines cassettes DC8 et DC4 relancent l'hypothèse de phénotypes de cytoadhérence multiples au niveau du globule rouge parasité. En effet, c'est la première fois que pour deux motifs protéiques de DC, un phénotype de cytoadhérence y est attribué. Cette hypothèse doit être vérifiée par d'autres investigations *in vitro* et surtout *in vivo* afin de confirmer les phénotypes observés dans notre étude et d'investiguer le phénotype de cytoadhérence sur EPCR pour expliquer l'absence de significativité dans notre population.

L'ensemble de ces résultats obtenus à partir d'une population présentant un accès palustre d'importation a mis en évidence des mécanismes physiopathologiques et des interactions

hôte-parasite qui n'avaient été jusqu'alors mis en évidence qu'en zone d'endémie et y apporte des nuances et des précisions dans un environnement où l'exposition au parasite est maîtrisée et les moyens d'investigations plus importants. L'effet protecteur de la pré-exposition à *Plasmodium falciparum* avait été décrit pour une exposition continue et intense au parasite en zone d'endémie et l'étude dans le cadre du paludisme d'importation révèle que cette protection peut perdurer en l'absence d'exposition continue. De plus, la découverte de l'implication des gènes du groupe A, B et des domaines cassettes DC4, DC5, DC8 et DC13 dans le paludisme « très grave » d'importation et de la participation de DC4 et DC8 dans le phénomène de *rosetting* également dans les formes graves associées à une forte mortalité prouvent que paludisme grave d'importation et le paludisme grave en zone d'endémie sont soumis aux mêmes mécanismes physiopathologiques et font intervenir les mêmes facteurs parasitaires pour la séquestration parasitaire. Le paludisme d'importation représente donc une entité clinique proche du paludisme grave en zone d'endémie malgré une population de patients différente mais s'apparenterait davantage aux présentations de paludisme grave observé dans les zones de paludisme instable telles que les régions du Sud-Est asiatique. Dans ces régions, le paludisme grave est caractérisé par l'atteinte neurologique [229], l'état de choc [230] et l'insuffisance rénale aiguë [231] et touche toutes les générations comme dans le contexte du paludisme d'importation [232]. De plus, les principaux facteurs de risque de paludisme grave identifiés dans ces populations d'Asie sont identiques à ceux des patients en zone non endémique avec le délai de prise en charge, l'absence d'antécédents de paludisme et l'origine ethnique [233] ce qui impliquerait que les différents mécanismes physiopathologiques de l'accès palustre grave mis en évidence dans plusieurs populations avec des degrés d'exposition variés, ne seraient pas liés à l'origine géographique de la souche de *Plasmodium falciparum* mais le résultat de la pression immunitaire de l'hôte sur le

parasite, acquise progressivement au fur et à mesure des expositions successives au parasite mais pérenne.

Le paludisme d'importation en France métropolitaine pourrait ainsi être le reflet du paludisme tel qu'il pourrait être dans de nombreuses années. Suite aux programmes d'éradication du paludisme en zones intertropicales, l'épidémiologie des populations infectées dans ces zones changent et de plus en plus d'adultes, par des réexpositions ponctuelles, présentent des accès palustres contre lesquels ils étaient « prémunis » [234]. L'hypothèse d'une exposition similaire des patients migrants africains qui déclarent un accès palustre d'importation est émise, caractérisant le paludisme d'importation comme le modèle du paludisme en cours d'éradication dans certaines régions.

Les perspectives possibles de ces différents travaux seraient selon plusieurs axes :

- Les résultats sur le statut sérologique des patients en fonction de la présentation clinique ont mis en évidence des titres d'anticorps élevés dans le paludisme « très grave » et le paludisme simple. Ces données quantitatives plus que qualitatives doivent être investiguées pour identifier les antigènes de surface, dont potentiellement ceux impliqués dans la séquestration parasitaire, préférentiellement reconnus par le système immunitaire de l'hôte au cours de l'accès palustre et aussi confirmer l'effet de la pré-exposition au parasite sur cette réponse humorale dans l'hypothèse d'une acquisition séquentielle de l'immunité anti-palustre.
- L'identification du sous groupe de gènes *var* et des DC impliqués dans le paludisme « très grave » doit être confirmée sur une autre population de patients ayant contracté un paludisme d'importation et élargir cette identification à d'autres sous groupes cliniques du paludisme d'importation mieux définis tels que l'état de choc, l'insuffisance rénale aigue organique ou la détresse respiratoire lors du paludisme

grave. Cette étude permettrait en parallèle d'apporter des informations supplémentaires sur les complexes interactions hôte-parasite au cours de différents tableaux cliniques.

- L'implication de DBL α 2 et de DBL β 3 dans le phénomène de *rosetting* doit être investiguée par des études *in vitro* et complétée par d'autres études sur des populations présentant d'autres formes cliniques de gravité. Si ces motifs protéiques représentent véritablement des protéines « candidat vaccins », une étude du polymorphisme de ces séquences doit également être entreprise en parallèle sur différentes souches de *Plasmodium falciparum* et sur d'autres isolats cliniques de l'espèce.
- Suite aux résultats de l'étude du phénotype de cytoadhérence, il semblerait que le *rosetting* n'explique pas toutes les formes graves observées laissant soupçonner d'autres phénotypes de cytoadhérence impliqués ou d'autres mécanismes physiopathologiques intervenant dans ce tableau de gravité qui devront être étudiés notamment la réponse immunitaire exacerbée lors du paludisme grave.

REFERENCES

- [1] World Health Organization. World malaria report 2014. [2014 Dec 9]. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en/.
- [2] World Health Organization. International travel and health. [22-Oct-2014]. <http://www.who.int/ith/en/>.
- [3] H. H. Askling, F. Bruneel, G. Burchard, F. Castelli, P. L. Chiodini, M. P. Grobusch, R. Lopez-Vélez, M. Paul, E. Petersen, C. Popescu, M. Ramharter, P. Schlagenhauf, and European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases Study Group on Clinical Parasitology. Management of imported malaria in Europe. *Malar. J.* 2012 ; 11 : 328.
- [4] Centre National de Référence du Paludisme pour la France métropolitaine. Rapports annuels. [22-Oct-2014] <http://www.cnrpalu-france.org/pages/rapports-annuels/>.
- [5] A. Phillips, P. Bassett, S. Zeki, S. Newman, and G. Pasvol. Risk factors for severe disease in adults with falciparum malaria. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48 (7): 871–878.
- [6] E. Seringe, M. Thellier, A. Fontanet, F. Legros, O. Bouchaud, T. Ancelle, E. Kendjo, S. Houze, J. Le Bras, M. Danis, R. Durand, and French National Reference Center for Imported Malaria Study Group. Severe imported Plasmodium falciparum malaria, France, 1996-2003. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (5): 807–813.
- [7] A. M. Checkley, A. Smith, V. Smith, M. Blaze, D. Bradley, P. L. Chiodini, and C. J. M. Whitty. Risk factors for mortality from imported falciparum malaria in the United Kingdom over 20 years: an observational study. *BMJ.* 2012 ; 344 : e2116.
- [8] M. Vaucel. Quelques étapes dans l'acquisition de nos connaissances sur le paludisme. *Hist Sci Méd.* 1969 ; 3 : 13-21.
- [9] J.-C. Petithory. A propos de la découverte de l'hématozoaire du paludisme par A. Laveran Bône 1878-Constantine 1880. *Hist Sci Méd.* 1995 ; 29 : 57–61.
- [10] A. Laveran. Du paludisme et de son hématozoaire. Paris : Masson, 1891.
- [11] N. J. White, S. Pukrittayakamee, T. T. Hien, M. A. Faiz, O. A. Mokuolu, and A. M. Dondorp. Malaria. *Lancet.* 2014; 383 (9918): 723–735.

- [12] World Health Organization. Global Malaria Mapper. [17-Mar-2015]. <http://worldmalaria-report.org/>.
- [13] T. Jelinek, C. Schulte, R. Behrens, M. P. Grobusch, J. P. Coulaud, Z. Bisoffi, A. Matteelli, J. Clerinx, M. Corachán, S. Puente, I. Gjørup, G. Harms, H. Kollaritsch, A. Kotlowski, A. Björkmann, J. P. Delmont, J. Knobloch, L. N. Nielsen, J. Cuadros, C. Hatz, J. Beran, M. L. Schmid, M. Schulze, R. Lopez-Velez, K. Fleischer, A. Kapaun, P. McWhinney, P. Kern, J. Atougia, G. Fry, S. da Cunha, and G. Boecken. Imported *Falciparum* malaria in Europe: sentinel surveillance data from the European network on surveillance of imported infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 2002; 34 (5): 572–576.
- [14] K. Leder, J. Black, D. O’Brien, Z. Greenwood, K. C. Kain, E. Schwartz, G. Brown, and J. Torresi. Malaria in travelers: a review of the GeoSentinel surveillance network. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 39 (8): 1104–1112.
- [15] R. M. Jennings, J. B. DE Souza, J. E. Todd, M. Armstrong, K. L. Flanagan, E. M. Riley, and J. F. Doherty. Imported *Plasmodium falciparum* malaria: are patients originating from disease-endemic areas less likely to develop severe disease? A prospective, observational study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75 (6): 1195–1199.
- [16] P. E. Neave, C. O. H. Jones, and R. H. Behrens. A review of risk factors for imported malaria in the European African diaspora. *J Travel Med.* 2010; 17 (5): 346–350.
- [17] S. J. Lewis, R. N. Davidson, E. J. Ross, and A. P. Hall. Severity of imported *falciparum* malaria: effect of taking antimalarial prophylaxis. *BMJ.* 1992; 305 (6856): 741–743.
- [18] K. Vliegenthart-Jongbloed, M. de Mendonça Melo, M. E. van Wolfswinkel, R. Koelewijn, J. J. van Hellemond, and P. J. J. van Genderen. Severity of imported malaria: protective effect of taking malaria chemoprophylaxis. *Malar. J.* 2013; 12: 265.
- [19] World Health Organization. Severe and complicated malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990; 84: 1–65.
- [20] World Health Organization. Severe *falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000; 94: S1–90.
- [21] Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française, Collège des Universitaires de Maladies Infectieuses et Tropicales, Société Française de Médecine des Armées, Société

Française de Parasitologie, Société Française de Pédiatrie, Société de Médecine des Voyages, Société de Pathologie Exotique, and Société de Réanimation de Langue Française. Management and prevention of imported *Plasmodium falciparum* malaria (Revision 2007 of the 1999 Consensus Conference). *Médecine Mal. Infect.* 2008; 38 (2): 68–117.

- [22] N. M. Anstey and R. N. Price. Improving case definitions for severe malaria. *PLoS Med.* 2007; 4 (8): e267.
- [23] F. Bruneel, F. Tubach, P. Corne, B. Megarbane, J.-P. Mira, E. Peytel, C. Camus, F. Schortgen, E. Azoulay, Y. Cohen, H. Georges, A. Meybeck, H. Hyvernats, J.-L. Trouillet, E. Frenoy, L. Nicolet, C. Roy, R. Durand, J. Le Bras, M. Wolff, and Severe Imported Malaria in Adults (SIMA) Study Group. Severe imported *falciparum* malaria: a cohort study in 400 critically ill adults. *PloS One.* 2010; 5 (10): e13236.
- [24] M. E. Marks, M. Armstrong, M. M. Suvari, S. Batson, C. J. M. Whitty, P. L. Chiodini, G. Bellinghan, and J. F. Doherty. Severe imported *falciparum* malaria among adults requiring intensive care: a retrospective study at the hospital for tropical diseases, London. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 118.
- [25] A. González, J. M. Nicolás, J. Muñoz, P. Castro, J. Mas, M. E. Valls, J. R. Coma, J. Aibar, and J. Gascon. Severe imported malaria in adults: retrospective study of 20 cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 81 (4): 595–599.
- [26] L. C. Santos, C. F. Abreu, S. M. Xerinda, M. Tavares, R. Lucas, and A. C. Sarmiento. Severe imported malaria in an intensive care unit: a review of 59 cases. *Malar. J.* 2012 ; 11 : 960.
- [27] F. Bruneel, L. Hocqueloux, C. Alberti, M. Wolff, S. Chevret, J.-P. Bédos, R. Durand, J. Le Bras, B. Régnier, and F. Vachon. The clinical spectrum of severe imported *falciparum* malaria in the intensive care unit: report of 188 cases in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003; 167 (5): 684–689.
- [28] F. Castéla, F. Legros, and B. Lagardère. Imported malaria in children in France. *Arch. Pédiatrie;* 10 (9): 758–765.
- [29] E. J. Nilles and P. M. Arguin. Imported malaria: an update. *Am. J. Emerg. Med.* 2012; 30 (6): 972–980.

- [30] World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria. 2nd ed. Geneva. 2010.
- [31] frottis sanguin au MGG. [cédéron] CDANOFEL 4. 2010.
- [32] goutte épaisse colorée au giemsa. [cédéron] CDANOFEL 4. 2010.
- [33] D. J. Sullivan, I. Y. Gluzman, and D. E. Goldberg. Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins. *Science*. 1996; 271 (5246): 219–222.
- [34] C. Y. Choi, J. F. Cerda, H. A. Chu, G. T. Babcock, and M. A. Marletta. Spectroscopic characterization of the heme-binding sites in Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2. *Biochemistry*. 1999; 38 (51): 16916–16924.
- [35] P. Kumari, D. Sahal, and V. S. Chauhan. Dendrimeric template of Plasmodium falciparum histidine rich protein II repeat motifs bearing Asp→Asn mutation exhibits heme binding and β -hematin formation. *PloS One*. 2014; 9 (11): e112087.
- [36] A. Moody. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (1): 66–78.
- [37] S. Houzé, I. Boutron, A. Marmorat, M. Dalichampt, C. Choquet, I. Poilane, N. Godineau, A.-S. Le Guern, M. Thellier, H. Broutier, O. Fenneteau, P. Millet, S. Dulucq, V. Hubert, P. Houzé, F. Tubach, J. Le Bras, and S. Matheron. Performance of rapid diagnostic tests for imported malaria in clinical practice: results of a national multicenter study. *PloS One*. 2013; 8 (9): e75486.
- [38] K. Khairnar, D. Martin, R. Lau, F. Ralevski, and D. R. Pillai. Multiplex real-time quantitative PCR, microscopy and rapid diagnostic immuno-chromatographic tests for the detection of Plasmodium spp: performance, limit of detection analysis and quality assurance. *Malar. J.* 2009 ; 8 : 284.
- [39] P. Gillet, A. Scheirlinck, J. Stokx, A. De Weggheleire, H. S. Chaúque, O. D. J. V. Canhanga, B. T. Tadeu, C. D. D. Mosse, A. Tiago, S. Mabunda, C. Bruggeman, E. Bottieau, and J. Jacobs. Prozone in malaria rapid diagnostics tests: how many cases are missed? *Malar. J.* 2011; 10: 166.

- [40] F. Gay, B. Traoré, J. Zanoni, M. Danis, and M. Gentilini. Evaluation of the QBC system for the diagnosis of malaria. *Santé*. 1994; 4 (4): 289–297.
- [41] Y. Secardin and J. Le Bras. Diagnostic test to identify human *Plasmodium* species by the quantitative buffy coat test. *Médecine Trop. Rev.* 1999; 59 (3): 276–278.
- [42] C. Wongsrichanalai, V. Namsiripongpun, J. Pornsilapatip, D. E. Kyle, and H. Wilde. Sensitivity of QBC malaria test. *Lancet*. 1992; 340 (8822): 792–793.
- [43] QBC. [cédéron] CDANOFEL 4. 2010.
- [44] G. Snounou, S. Viriyakosol, X. P. Zhu, W. Jarra, L. Pinheiro, V. E. do Rosario, S. Thaithong, and K. N. Brown. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993; 61 (2): 315–320.
- [45] G. Snounou, S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong, and K. N. Brown. Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993; 58 (2): 283–292.
- [46] E. Kamau, S. Alemayehu, K. C. Feghali, D. Saunders, and C. F. Ockenhouse. Multiplex qPCR for detection and absolute quantification of malaria. *PloS One*. 2013; 8 (8): e71539.
- [47] M. E. Reller, W. H. Chen, J. Dalton, M. A. Lichay, and J. S. Dumler. Multiplex 5' nuclease quantitative real-time PCR for clinical diagnosis of malaria and species-level identification and epidemiologic evaluation of malaria-causing parasites, including *Plasmodium knowlesi*. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51 (9): 2931–2938.
- [48] L. Dormond, K. Jatou-Ogay, S. de Vallière, B. Genton, J. Bille, and G. Greub. Multiplex real-time PCR for the diagnosis of malaria: correlation with microscopy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17 (3): 469–475.
- [49] K. A. Mangold, R. U. Manson, E. S. C. Koay, L. Stephens, M. Regner, R. B. Thomson, L. R. Peterson, and K. L. Kaul. Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43 (5): 2435–2440.

- [50] S. Alemayehu, K. C. Feghali, J. Cowden, J. Komisar, C. F. Ockenhouse, and E. Kamau. Comparative evaluation of published real-time PCR assays for the detection of malaria following MIQE guidelines. *Malar. J.* 2013; 12: 277.
- [51] M. Rougemont, M. Van Saanen, R. Sahli, H. P. Hinrikson, J. Bille, and K. Jatou. Detection of Four Plasmodium Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42 (12): 5636–5643.
- [52] D. A. Lampah, T. W. Yeo, M. Malloy, E. Kenangalem, N. M. Douglas, D. Ronaldo, P. Sugiarto, J. A. Simpson, J. R. Poespoprodjo, N. M. Anstey, and R. N. Price. Severe Malarial Thrombocytopenia: A Risk Factor for Mortality in Papua, Indonesia. *J. Infect. Dis.* 2015; 211 (4): 623-634.
- [53] S. Stauga, A. Hahn, N. W. Brattig, J. Fischer-Herr, S. Baldus, G. D. Burchard, and J. P. Cramer. Clinical relevance of different biomarkers in imported plasmodium falciparum malaria in adults: a case control study. *Malar. J.* 2013; 12: 246.
- [54] B. Uzzan, A. Izri, R. Durand, M. Deniau, O. Bouchaud, and G.-Y. Perret. Serum procalcitonin in uncomplicated falciparum malaria: a preliminary study. *Travel Med. Infect. Dis.* 2006; 4 (2): 77–80.
- [55] D. A. Hesselink, J.-S. Burgerhart, H. Bosmans-Timmerarends, P. Petit, and P. J. J. van Genderen. Procalcitonin as a biomarker for severe Plasmodium falciparum disease: a critical appraisal of a semi-quantitative point-of-care test in a cohort of travellers with imported malaria. *Malar. J.* 2009; 8: 206.
- [56] A. M. Dondorp, V. Desakorn, W. Pongtavornpinyo, D. Sahassananda, K. Silamut, K. Chotivanich, P. N. Newton, P. Pitisuttithum, A. M. Smithyman, N. J. White, and N. P. J. Day. Estimation of the total parasite biomass in acute falciparum malaria from plasma PfHRP2. *PLoS Med.* 2005; 2 (8): e204.
- [57] I. C. E. Hendriksen, J. Mwanga-Amumpaire, L. von Seidlein, G. Mtove, L. J. White, R. Olaosebikan, S. J. Lee, A. K. Tshefu, C. Woodrow, B. Amos, C. Karema, S. Saiwaew, K. Maitland, E. Gomes, W. Pan-Ngum, S. Gesase, K. Silamut, H. Reyburn, S. Joseph, K. Chotivanich, C. I. Fanello, N. P. J. Day, N. J. White, and A. M. Dondorp. Diagnosing severe falciparum malaria in parasitaemic African children: a prospective evaluation of plasma PfHRP2 measurement. *PLoS Med.* 2012; 9 (8): e1001297.

- [58] M. P. Rubach, J. Mukemba, S. Florence, B. John, B. Crookston, B. K. Lopansri, T. W. Yeo, K. A. Piera, S. C. Alder, J. B. Weinberg, N. M. Anstey, D. L. Granger, and E. D. Mwaikambo. Plasma Plasmodium falciparum histidine-rich protein-2 concentrations are associated with malaria severity and mortality in Tanzanian children. *PloS One*. 2012; 7 (5): e35985.
- [59] I. C. E. Hendriksen, L. J. White, J. Veenemans, G. Mtove, C. Woodrow, B. Amos, S. Saiwaew, S. Gesase, B. Nadjm, K. Silamut, S. Joseph, K. Chotivanich, N. P. J. Day, L. von Seidlein, H. Verhoef, H. Reyburn, N. J. White, and A. M. Dondorp. Defining falciparum-malaria-attributable severe febrile illness in moderate-to-high transmission settings on the basis of plasma PfHRP2 concentration. *J. Infect. Dis.* 2013; 207 (2): 351–361.
- [60] L. L. Fox, T. E. Taylor, P. Pensulo, A. Liomba, A. Mpakiza, A. Varela, S. J. Glover, M. J. Reeves, and K. B. Seydel. Histidine-rich protein 2 plasma levels predict progression to cerebral malaria in Malawian children with Plasmodium falciparum infection. *J. Infect. Dis.* 2013; 208 (3): 500–503.
- [61] M. Imwong, C. J. Woodrow, I. C. E. Hendriksen, J. Veenemans, H. Verhoef, M. A. Faiz, S. Mohanty, S. Mishra, G. Mtove, S. Gesase, A. Seni, K. D. Chhaganlal, N. P. J. Day, A. M. Dondorp, and N. J. White. Plasma concentration of parasite DNA as a measure of disease severity in falciparum malaria. *J. Infect. Dis.* 2015; 211 (7): 1128-1133.
- [62] P. Ambroise-Thomas. The immunofluorescence reaction in the seroimmunological study of malaria. *Bull. World Health Organ.* 1974; 50 (3): 267–276.
- [63] M. E. De Carvalho, M. U. Ferreira, M. R. De Souza, R. T. Ninomia, G. F. Matos, L. M. Camargo, and C. S. Ferreira. Malaria seroepidemiology: comparison between indirect fluorescent antibody test and enzyme immunoassay using bloodspot eluates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1992; 87 (2): 205–208.
- [64] K. Silamut, N. H. Phu, C. Whitty, G. D. Turner, K. Louwrier, N. T. Mai, J. A. Simpson, T. T. Hien, and N. J. White. A quantitative analysis of the microvascular sequestration of malaria parasites in the human brain. *Am. J. Pathol.* 1999; 155 (2): 395–410.
- [65] F. Silvestrini, M. Tibúrcio, L. Bertuccini, and P. Alano. Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of Plasmodium falciparum on human endothelial cells are tissue independent. *PloS One*. 2012; 7 (2): e31567.

- [66] D. S. Khoury, D. Cromer, S. E. Best, K. R. James, P. S. Kim, C. R. Engwerda, A. Haque, and M. P. Davenport. Effect of mature blood-stage *Plasmodium* parasite sequestration on pathogen biomass in mathematical and in vivo models of malaria. *Infect. Immun.* 2014; 82 (1): 212–220.
- [67] Q. Chen, M. Schlichtherle, and M. Wahlgren. Molecular aspects of severe malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13 (3): 439–450.
- [68] J. A. Rowe, A. Claessens, R. A. Corrigan, and M. Arman. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009; 11: e16.
- [69] J.-A. Chan, F. J. I. Fowkes, and J. G. Beeson. Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014; 71 (19): 3633–3657.
- [70] C. A. Moxon, G. E. Grau, and A. G. Craig. Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host. *Br. J. Haematol.* 2011; 154 (6): 670–679.
- [71] K. A. Quadt, L. Barfod, D. Andersen, J. Bruun, B. Gyan, T. Hassenkam, M. F. Ofori, and L. Hviid. The density of knobs on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes depends on developmental age and varies among isolates. *PloS One.* 2012; 7 (9): e45658.
- [72] D. I. Baruch, B. L. Pasloske, H. B. Singh, X. Bi, X. C. Ma, M. Feldman, T. F. Taraschi, and R. J. Howard. Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell.* 1995; 82 (1): 77–87.
- [73] J. H. Leech, J. W. Barnwell, L. H. Miller, and R. J. Howard. Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Exp. Med.* 1984; 159 (6): 1567–1575.
- [74] S. M. Taylor, C. Cerami, and R. M. Fairhurst. Hemoglobinopathies: slicing the Gordian knot of *Plasmodium falciparum* malaria pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (5): e1003327.

- [75] J. D. Smith. The role of PfEMP1 adhesion domain classification in *Plasmodium falciparum* pathogenesis research. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2014; 195 (2): 82-87.
- [76] J. D. Smith, J. A. Rowe, M. K. Higgins, and T. Lavstsen. Malaria's deadly grip: cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell. Microbiol.* 2013; 15 (12): 1976–1983.
- [77] T. S. Rask, D. A. Hansen, T. G. Theander, A. Gorm Pedersen, and T. Lavstsen. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes--divide and conquer. *PLoS Comput. Biol.* 2010; 6 (9).
- [78] A. Bengtsson, L. Joergensen, T. S. Rask, R. W. Olsen, M. A. Andersen, L. Turner, T. G. Theander, L. Hviid, M. K. Higgins, A. Craig, A. Brown, and A. T. R. Jensen. A novel domain cassette identifies *Plasmodium falciparum* PfEMP1 proteins binding ICAM-1 and is a target of cross-reactive, adhesion-inhibitory antibodies. *J. Immunol.* 2013; 190 (1): 240–249.
- [79] S. S. Berger, L. Turner, C. W. Wang, J. E. V. Petersen, M. Kraft, J. P. A. Lusingu, B. Mmbando, A. M. Marquard, D. B. A. C. Bengtsson, L. Hviid, M. A. Nielsen, T. G. Theander, and T. Lavstsen. *Plasmodium falciparum* expressing domain cassette 5 type PfEMP1 (DC5-PfEMP1) bind PECAM1. *PloS One.* 2013; 8 (7): e69117.
- [80] M. Avril, A. K. Tripathi, A. J. Brazier, C. Andisi, J. H. Janes, V. L. Soma, D. J. Sullivan, P. C. Bull, M. F. Stins, and J. D. Smith. A restricted subset of var genes mediates adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to brain endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109 (26): E1782–1790.
- [81] A. Claessens, Y. Adams, A. Ghumra, G. Lindergard, C. C. Buchan, C. Andisi, P. C. Bull, S. Mok, A. P. Gupta, C. W. Wang, L. Turner, M. Arman, A. Raza, Z. Bozdech, and J. A. Rowe. A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109 (26): E1772–1781.
- [82] T. Lavstsen, L. Turner, F. Saguti, P. Magistrado, T. S. Rask, J. S. Jespersen, C. W. Wang, S. S. Berger, V. Baraka, A. M. Marquard, A. Seguin-Orlando, E. Willerslev, M. T. P. Gilbert, J. Lusingu, and T. G. Theander. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domain cassettes 8 and 13 are associated with severe malaria in children. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109 (26): E1791–1800.

- [83] G. I. Bertin, T. Lavstsen, F. Guillonéau, J. Doritchamou, C. W. Wang, J. S. Jespersen, S. Ezimegnon, N. Fievet, M. J. Alao, F. Lalya, A. Massougbdji, N. T. Ndam, T. G. Theander, and P. Deloron. Expression of the domain cassette 8 *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is associated with cerebral malaria in Benin. *PloS One*. 2013; 8 (7): e68368.
- [84] M. E. Patarroyo, M. P. Alba, H. Curtidor, M. Vanegas, H. Almonacid, and M. A. Patarroyo. Using the PfEMP1 head structure binding motif to deal a blow at severe malaria. *PloS One*. 2014; 9 (2): e88420.
- [85] D. I. Baruch, J. A. Gormely, C. Ma, R. J. Howard, and B. L. Pasloske. *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.* 1996; 93 (8): 3497–3502.
- [86] J. H. Janes, C. P. Wang, E. Levin-Edens, I. Vigan-Womas, M. Guillotte, M. Melcher, O. Mercereau-Puijalon, and J. D. Smith. Investigating the host binding signature on the *Plasmodium falciparum* PfEMP1 protein family. *PLoS Pathog.* 2011; 7 (5): e1002032.
- [87] L. B. Ochola, B. R. Siddondo, H. Ocholla, S. Nkya, E. N. Kimani, T. N. Williams, J. O. Makale, A. Liljander, B. C. Urban, P. C. Bull, T. Szestak, K. Marsh, and A. G. Craig. Specific receptor usage in *Plasmodium falciparum* cytoadherence is associated with disease outcome. *PloS One*. 2011; 6 (3): e14741.
- [88] T. Almelli, N. T. Ndam, S. Ezimegnon, M. J. Alao, C. Ahouansou, G. Sagbo, A. Amoussou, P. Deloron, and R. Tahar. Cytoadherence phenotype of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is associated with specific pfemp-1 expression in parasites from children with cerebral malaria. *Malar. J.* 2014; 13: 333.
- [89] C. M. Cserti-Gazdewich, W. R. Mayr, and W. H. Dzik. *Plasmodium falciparum* malaria and the immunogenetics of ABO, HLA, and CD36 (platelet glycoprotein IV). *Vox Sang.* 2011; 100 (1): 99–111.
- [90] S. J. Rogerson, R. Tembenu, C. Dobaño, S. Plitt, T. E. Taylor, and M. E. Molyneux. Cytoadherence characteristics of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian children with severe and uncomplicated malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 61 (3): 467–472.

- [91] L. Turner, T. Lavstsen, S. S. Berger, C. W. Wang, J. E. V. Petersen, M. Avril, A. J. Brazier, J. Freeth, J. S. Jespersen, M. A. Nielsen, P. Magistrado, J. Lusingu, J. D. Smith, M. K. Higgins, and T. G. Theander. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature*. 2013; 498 (7455): 502–505.
- [92] L. V. Mohan Rao, C. T. Esmon, and U. R. Pendurthi. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood*. 2014; 124 (10): 1553–1562.
- [93] A. Rowe, J. Obeiro, C. I. Newbold, and K. Marsh. *Plasmodium falciparum* rosetting is associated with malaria severity in Kenya. *Infect. Immun.* 1995; 63 (6): 2323–2326.
- [94] K. Kirchgatter and H. del A. Portillo. Association of severe noncerebral *Plasmodium falciparum* malaria in Brazil with expressed PfEMP1 DBL1 alpha sequences lacking cysteine residues. *Mol. Med.* 2002; 8 (1): 16–23.
- [95] L. Albrecht, K. Moll, K. Blomqvist, J. Normark, Q. Chen, and M. Wahlgren. *var* gene transcription and PfEMP1 expression in the rosetting and cytoadhesive *Plasmodium falciparum* clone FCR3S1.2. *Malar. J.* 2011; 10: 17.
- [96] J. Mugasa, W. Qi, S. Rusch, M. Rottmann, and H.-P. Beck. Genetic diversity of expressed *Plasmodium falciparum var* genes from Tanzanian children with severe malaria. *Malar. J.* 2012; 11: 230.
- [97] J. A. Rowe, J. Shafi, O. K. Kai, K. Marsh, and A. Raza. Nonimmune IgM, but not IgG binds to the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and correlates with rosetting and severe malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 66 (6): 692–699.
- [98] L. Barfod, M. B. Dalgaard, S. T. Pleman, M. F. Ofori, R. J. Pleass, and L. Hviid. Evasion of immunity to *Plasmodium falciparum* malaria by IgM masking of protective IgG epitopes in infected erythrocyte surface-exposed PfEMP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108 (30): 12485–12490.
- [99] L. Joergensen, D. C. Bengtsson, A. Bengtsson, E. Ronander, S. S. Berger, L. Turner, M. B. Dalgaard, G. K. K. Cham, M. E. Victor, T. Lavstsen, T. G. Theander, D. E. Arnot, and A. T. R. Jensen. Surface co-expression of two different PfEMP1 antigens on single *plasmodium falciparum*-infected erythrocytes facilitates binding to ICAM1 and PECAM1. *PLoS Pathog.* 2010; 6 (9): e1001083.

- [100] Y. Adams, P. Kuhnrae, M. K. Higgins, A. Ghumra, and J. A. Rowe. Rosetting *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind to human brain microvascular endothelial cells in vitro, demonstrating a dual adhesion phenotype mediated by distinct *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domains. *Infect. Immun.* 2014; 82 (3): 949–959.
- [101] M. M. Zilversmit, E. K. Chase, D. S. Chen, P. Awadalla, K. P. Day, and G. McVean. Hypervariable antigen genes in malaria have ancient roots. *BMC Evol. Biol.* 2013; 13: 110.
- [102] N. Rasti, M. Wahlgren, and Q. Chen. Molecular aspects of malaria pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004; 41 (1): 9–26.
- [103] K. Kirchgatter and H. A. Del Portillo. Clinical and molecular aspects of severe malaria. *An. Acad. Bras.* 2005; 77 (3): 455–475.
- [104] Q. Chen, V. Fernandez, A. Sundström, M. Schlichtherle, S. Datta, P. Hagblom, and M. Wahlgren. Developmental selection of var gene expression in *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 1998; 394 (6691): 392–395.
- [105] P. C. Bull, C. O. Buckee, S. Kyes, M. M. Kortok, V. Thathy, B. Guyah, J. A. Stoute, C. I. Newbold, and K. Marsh. *Plasmodium falciparum* antigenic variation. Mapping mosaic var gene sequences onto a network of shared, highly polymorphic sequence blocks. *Mol. Microbiol.* 2008; 68 (6): 1519–1534.
- [106] J. D. Smith, C. E. Chitnis, A. G. Craig, D. J. Roberts, D. E. Hudson-Taylor, D. S. Peterson, R. Pinches, C. I. Newbold, and L. H. Miller. Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell.* 1995; 82 (1): 101–110.
- [107] J. Peters, E. Fowler, M. Gatton, N. Chen, A. Saul, and Q. Cheng. High diversity and rapid changeover of expressed var genes during the acute phase of *Plasmodium falciparum* infections in human volunteers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002; 99 (16): 10689–10694.
- [108] T. Lavstsen, A. Salanti, A. T. R. Jensen, D. E. Arnot, and T. G. Theander. Subgrouping of *Plasmodium falciparum* 3D7 var genes based on sequence analysis of coding and non-coding regions. *Malar. J.* 2003; 2: 27.

- [109] C. W. Wang, T. Lavstsen, D. C. Bengtsson, P. A. Magistrado, S. S. Berger, A. M. Marquard, M. Alifrangis, J. P. Lusingu, T. G. Theander, and L. Turner. Evidence for in vitro and in vivo expression of the conserved VAR3 (type 3) plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1. *Malar. J.* 2012; 11: 129.
- [110] P. A. Magistrado, T. Staalsoe, T. G. Theander, L. Hviid, and A. T. Jensen. CD36 selection of 3D7 Plasmodium falciparum associated with severe childhood malaria results in reduced VAR4 expression. *Malar. J.* 2008; 7: 204.
- [111] M. Kaestli, A. Cortes, M. Lagog, M. Ott, and H.-P. Beck. Longitudinal assessment of Plasmodium falciparum var gene transcription in naturally infected asymptomatic children in Papua New Guinea. *J. Infect. Dis.* 2004; 189 (10): 1942–1951.
- [112] M. Kaestli, I. A. Cockburn, A. Cortés, K. Baea, J. A. Rowe, and H.-P. Beck. Virulence of malaria is associated with differential expression of Plasmodium falciparum var gene subgroups in a case-control study. *J. Infect. Dis.* 2006; 193 (11): 1567–1574.
- [113] N. Falk, M. Kaestli, W. Qi, M. Ott, K. Baea, A. Cortés, and H.-P. Beck. Analysis of Plasmodium falciparum var genes expressed in children from Papua New Guinea. *J. Infect. Dis.* 2009; 200 (3): 347–356.
- [114] A. T. R. Jensen, P. Magistrado, S. Sharp, L. Joergensen, T. Lavstsen, A. Chiuichiuni, A. Salanti, L. S. Vestergaard, J. P. Lusingu, R. Hermsen, R. Sauerwein, J. Christensen, M. A. Nielsen, L. Hviid, C. Sutherland, T. Staalsoe, and T. G. Theander. Plasmodium falciparum associated with severe childhood malaria preferentially expresses PfEMP1 encoded by group A var genes. *J. Exp. Med.* 2004; 199 (9): 1179–1190.
- [115] J. Montgomery, F. A. Mphande, M. Berriman, A. Pain, S. J. Rogerson, T. E. Taylor, M. E. Molyneux, and A. Craig. Differential var gene expression in the organs of patients dying of falciparum malaria. *Mol. Microbiol.* 2007; 65 (4): 959–967.
- [116] M. Rottmann, T. Lavstsen, J. P. Mugasa, M. Kaestli, A. T. R. Jensen, D. Müller, T. Theander, and H.-P. Beck. Differential expression of var gene groups is associated with morbidity caused by Plasmodium falciparum infection in Tanzanian children. *Infect. Immun.* 2006; 74 (7): 3904–3911.
- [117] H. M. Kyriacou, G. N. Stone, R. J. Challis, A. Raza, K. E. Lyke, M. A. Thera, A. K. Koné, O. K. Doumbo, C. V. Plowe, and J. A. Rowe. Differential var gene transcription

- in *Plasmodium falciparum* isolates from patients with cerebral malaria compared to hyperparasitaemia. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006; 150 (2): 211–218.
- [118] Y. Kalmbach, M. Rottmann, M. Kombila, P. G. Kremsner, H.-P. Beck, and J. F. J. Kun. Differential var gene expression in children with malaria and antedromic effects on host gene expression. *J. Infect. Dis.* 2010; 202 (2): 313–317.
- [119] C. J. Merrick, C. Huttenhower, C. Buckee, A. Amambua-Ngwa, N. Gomez-Escobar, M. Walther, D. J. Conway, and M. T. Duraisingh. Epigenetic Dysregulation of Virulence Gene Expression in Severe *Plasmodium falciparum* Malaria. *J. Infect. Dis.* 2012; 205 (10): 1593–1600.
- [120] D. A. Milner, N. Pochet, M. Krupka, C. Williams, K. Seydel, T. E. Taylor, Y. Van de Peer, A. Regev, D. Wirth, J. P. Daily, and J. P. Mesirov. Transcriptional profiling of *Plasmodium falciparum* parasites from patients with severe malaria identifies distinct low vs. high parasitemic clusters. *PloS One.* 2012; 7 (7): e40739.
- [121] N. Horata, T. Kalambaheti, A. Craig, and S. Khusmith. Sequence variation of PfEMP1-DBLalpha in association with rosette formation in *Plasmodium falciparum* isolates causing severe and uncomplicated malaria. *Malar. J.* 2009; 8: 184.
- [122] M. M. Rorick, T. S. Rask, E. B. Baskerville, K. P. Day, and M. Pascual. Homology blocks of *Plasmodium falciparum* var genes and clinically distinct forms of severe malaria in a local population. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 244.
- [123] E. Rovira-Vallbona, C. Dobaño, A. Bardají, P. Cisteró, C. Romagosa, E. Serra-Casas, L. Quintó, Q. Bassat, B. Sigaúque, P. L. Alonso, J. Ordi, C. Menéndez, and A. Mayor. Transcription of var genes other than var2csa in *Plasmodium falciparum* parasites infecting Mozambican pregnant women. *J. Infect. Dis.* 2011; 204 (1): 27–35.
- [124] J. Doritchamou, G. Bertin, A. Moussiliou, P. Bigey, F. Viwami, S. Ezinmegnon, N. Fievet, A. Massougbdji, P. Deloron, and N. Tuikue Ndam. First-trimester *Plasmodium falciparum* infections display a typical ‘placental’ phenotype. *J. Infect. Dis.* 2012; 206 (12): 1911–1919.
- [125] F. Gay, S. Zougbedé, N. N’dilimabaka, A. Rebollo, D. Mazier, and A. Moreno. Cerebral malaria: what is known and what is on research. *Rev. Neurol.* 2012; 168 (3): 239–256.

- [126] E. N. Gitau, J. Tuju, H. Karanja, L. Stevenson, P. Requena, E. Kimani, A. Olotu, D. Kimani, K. Marsh, P. Bull, and B. C. Urban. CD4⁺ T cell responses to the Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 in children with mild malaria. *J. Immunol.* 2014; 192 (4): 1753–1761.
- [127] E. N. Gitau, J. Tuju, L. Stevenson, E. Kimani, H. Karanja, K. Marsh, P. C. Bull, and B. C. Urban. T-cell responses to the DBL α -tag, a short semi-conserved region of the Plasmodium falciparum membrane erythrocyte protein 1. *PloS One.* 2012; 7 (1): e30095.
- [128] L. A. Sanni, C. E. M. Allsopp, L. Reubsaet, A. Sanni, C. Newbold, V. S. Chauhan, and J. Langhorne. Cellular responses to Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1: use of relatively conserved synthetic peptide pools to determine CD4 T cell responses in malaria-exposed individuals in Benin, West Africa. *Malar. J.* 2002; 1: 7.
- [129] A. E. P. Frosch and C. C. John. Immunomodulation in Plasmodium falciparum malaria: experiments in nature and their conflicting implications for potential therapeutic agents. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2012; 10 (11): 1343–1356.
- [130] N. M. Gowda, X. Wu, S. Kumar, M. Febbraio, and D. C. Gowda. CD36 contributes to malaria parasite-induced pro-inflammatory cytokine production and NK and T cell activation by dendritic cells. *PloS One.* 2013; 8 (10): e77604.
- [131] T. O. Apinjoh, J. K. Anchang-Kimbi, C. Njua-Yafi, R. N. Mugri, A. N. Ngwai, K. A. Rockett, E. Mbunwe, R. N. Besingi, T. G. Clark, D. P. Kwiatkowski, E. A. Achidi, and MalariaGEN Consortium. Association of cytokine and Toll-like receptor gene polymorphisms with severe malaria in three regions of Cameroon. *PloS One.* 2013; 8 (11): e81071.
- [132] C. N. Morrell, A. A. Aggrey, L. M. Chapman, and K. L. Modjeski. Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood.* 2014; 123 (18): 2759–2767.
- [133] S. N. Hudson Keenihan, S. Ratiwayanto, S. Soebianto, null Krisin, H. Marwoto, G. Krishnegowda, D. C. Gowda, M. J. Bangs, D. J. Fryauff, T. L. Richie, S. Kumar, and J. K. Baird. Age-dependent impairment of IgG responses to glycosylphosphatidylinositol with equal exposure to Plasmodium falciparum among Javanese migrants to Papua, Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003; 69 (1): 36–41.

- [134] D. J. Perkins, T. Were, G. C. Davenport, P. Kempaiah, J. B. Hittner, and J. M. Ong'echa. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis. *Int. J. Biol. Sci.* 2011; 7 (9): 1427–1442.
- [135] G. Moncunill, A. Mayor, A. Jiménez, A. Nhabomba, L. Puyol, M. N. Manaca, D. Barrios, P. Cisteró, C. Guinovart, R. Aguilar, A. Bardají, M.-J. Pinazo, E. Angov, S. Dutta, C. E. Chitnis, J. Muñoz, J. Gascón, and C. Dobaño. Cytokine and antibody responses to *Plasmodium falciparum* in naïve individuals during a first malaria episode: effect of age and malaria exposure. *PloS One.* 2013; 8 (2): e55756.
- [136] G. MacMullin, R. Mackenzie, R. Lau, J. Khang, H. Zhang, N. Rajwans, W. C. Liles, and D. R. Pillai. Host immune response in returning travellers infected with malaria. *Malar. J.* 2012; 11: 148.
- [137] E. Rovira-Vallbona, G. Moncunill, Q. Bassat, R. Aguilar, S. Machevo, L. Puyol, L. Quintó, C. Menéndez, C. E. Chitnis, P. L. Alonso, C. Dobaño, and A. Mayor. Low antibodies against *Plasmodium falciparum* and imbalanced pro-inflammatory cytokines are associated with severe malaria in Mozambican children: a case-control study. *Malar. J.* 2012; 11: 181.
- [138] K. Maitland and C. R. J. C. Newton. Acidosis of severe *falciparum* malaria: heading for a shock? *Trends Parasitol.* 2005; 21 (1): 11–16.
- [139] Y. Wu, T. Szeszak, M. Stins, and A. G. Craig. Amplification of *P. falciparum* Cytoadherence through induction of a pro-adhesive state in host endothelium. *PloS One.* 2011; 6 (10): e24784.
- [140] C. A. Moxon, S. C. Wassmer, D. A. Milner, N. V. Chisala, T. E. Taylor, K. B. Seydel, M. E. Molyneux, B. Faragher, C. T. Esmon, C. Downey, C.-H. Toh, A. G. Craig, and R. S. Heyderman. Loss of endothelial protein C receptors links coagulation and inflammation to parasite sequestration in cerebral malaria in African children. *Blood.* 2013; 122 (5): 842–851.
- [141] A. Moussiliou, M. J. Alao, L. Denoed-Ndam, R. Tahar, S. Ezimegnon, G. Sagbo, A. Amoussou, A. J. F. Luty, P. Deloron, and N. Tuikue Ndam. High Plasma Levels of Soluble Endothelial Protein C Receptor Are Associated With Increased Mortality Among Children With Cerebral Malaria in Benin. *J. Infect. Dis.* 2015; 211 (9): 1484-1488.

- [142] J. A. López. Malignant malaria and microangiopathies: merging mechanisms. *Blood*. 2010; 115 (7): 1317–1318.
- [143] C. R. Newton, T. E. Taylor, and R. O. Whitten. Pathophysiology of fatal falciparum malaria in African children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58 (5): 673–683.
- [144] D. Nantakomol, A. M. Dondorp, S. Krudsood, R. Udomsangpetch, K. Pattanapanyasat, V. Combes, G. E. Grau, N. J. White, P. Viriyavejakul, N. P. J. Day, and K. Chotivanich. Circulating red cell-derived microparticles in human malaria. *J. Infect. Dis.* 2011; 203 (5): 700–706.
- [145] J. B. Pankoui Mfonkeu, I. Gouado, H. Fotso Kuate, O. Zambou, P. H. Amvam Zollo, G. E. R. Grau, and V. Combes. Elevated cell-specific microparticles are a biological marker for cerebral dysfunctions in human severe malaria. *PloS One*. 2010; 5 (10): e13415.
- [146] V. Combes, F. El-Assaad, D. Faille, R. Jambou, N. H. Hunt, and G. E. R. Grau. Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. *Prog. Neurobiol.* 2010; 91 (2): 140–151.
- [147] V. Combes, N. Coltel, D. Faille, S. C. Wassmer, and G. E. Grau. Cerebral malaria: role of microparticles and platelets in alterations of the blood-brain barrier. *Int. J. Parasitol.* 2006; 36 (5): 541–546.
- [148] S. Kraisin, A. Palasuwan, S. Popruk, and D. Nantakomol. Reduced ADAMTS13 activity is associated with an ADAMTS13 SNP, fever and microparticles in a malaria-like model. *Malar. J.* 2014; 13: 3.
- [149] P.-Y. Mantel, A. N. Hoang, I. Goldowitz, D. Potashnikova, B. Hamza, I. Vorobjev, I. Ghiran, M. Toner, D. Irimia, A. R. Ivanov, N. Barteneva, and M. Marti. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. *Cell Host Microbe*. 2013; 13 (5): 521–534.
- [150] U. Sahu, P. K. Sahoo, S. K. Kar, B. N. Mohapatra, and M. Ranjit. Association of TNF level with production of circulating cellular microparticles during clinical manifestation of human cerebral malaria. *Hum. Immunol.* 2013; 74 (6): 713–721.

- [151] D. Faille, V. Combes, A. J. Mitchell, A. Fontaine, I. Juhan-Vague, M.-C. Alessi, G. Chimini, T. Fusaï, and G. E. Grau. Platelet microparticles: a new player in malaria parasite cytoadherence to human brain endothelium. *FASEB J.* 2009; 23 (10): 3449–3458.
- [152] T. E. Taylor, W. J. Fu, R. A. Carr, R. O. Whitten, J. S. Mueller, N. G. Fosiko, S. Lewallen, N. G. Liomba, M. E. Molyneux, and J. G. Mueller. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat. Med.* 2004; 10 (2): 143–145.
- [153] D. L. Doolan, C. Dobaño, and J. K. Baird. Acquired immunity to malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009; 22 (1): 13–36.
- [154] J. K. Baird. Host age as a determinant of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today.* 1995; 11 (3): 105–111.
- [155] J. K. Baird, T. R. Jones, E. W. Danudirgo, B. A. Annis, M. J. Bangs, H. Basri, null Purnomo, and S. Masbar. Age-dependent acquired protection against *Plasmodium falciparum* in people having two years exposure to hyperendemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; 45 (1): 65–76.
- [156] J. K. Baird, null Purnomo, H. Basri, M. J. Bangs, E. M. Andersen, T. R. Jones, S. Masbar, S. Harjosuwarno, B. Subianto, and P. R. Arbani. Age-specific prevalence of *Plasmodium falciparum* among six populations with limited histories of exposure to endemic malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 49 (6): 707–719.
- [157] J. J. Aponte, C. Menendez, D. Schellenberg, E. Kahigwa, H. Mshinda, P. Vountasou, M. Tanner, and P. L. Alonso. Age interactions in the development of naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* and its clinical presentation. *PLoS Med.* 2007; 4 (7): e242.
- [158] C. Guinovart, C. Dobaño, Q. Bassat, A. Nhabomba, L. Quintó, M. N. Manaca, R. Aguilar, M. H. Rodríguez, A. Barbosa, J. J. Aponte, A. G. Mayor, M. Renom, C. Moraleda, D. J. Roberts, E. Schwarzer, P. N. Le Souëf, L. Schofield, C. E. Chitnis, D. L. Doolan, and P. L. Alonso. The role of age and exposure to *Plasmodium falciparum* in the rate of acquisition of naturally acquired immunity: a randomized controlled trial. *PloS One.* 2012; 7 (3): e32362.

- [159] A. E. Zeituni, K. Miura, M. Diakite, S. Doumbia, S. E. Moretz, A. Diouf, G. Tullo, T. M. Lopera-Mesa, C. D. Bess, N. K. Mita-Mendoza, J. M. Anderson, R. M. Fairhurst, and C. A. Long. Effects of age, hemoglobin type and parasite strain on IgG recognition of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes in Malian children. *PloS One*. 2013; 8 (10): e76734.
- [160] M. A. Travassos, A. Niangaly, J. A. Bailey, A. Ouattara, D. Coulibaly, M. B. Laurens, J. Pablo, A. Jasinskas, R. Nakajima-Sasaki, A. A. Berry, S. Takala-Harrison, B. Kouriba, J. A. Rowe, K. E. Lyke, O. K. Doumbo, M. A. Thera, P. L. Felgner, and C. V. Plowe. Seroreactivity to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 intracellular domain in malaria-exposed children and adults. *J. Infect. Dis.* 2013; 208 (9): 1514–1519.
- [161] E. Baum, K. Badu, D. M. Molina, X. Liang, P. L. Felgner, and G. Yan. Protein microarray analysis of antibody responses to *Plasmodium falciparum* in western Kenyan highland sites with differing transmission levels. *PloS One*. 2013; 8 (12): e82246.
- [162] A. J. Nhabomba, C. Guinovart, A. Jiménez, M. N. Manaca, L. Quintó, P. Cisteró, R. Aguilar, A. Barbosa, M. H. Rodríguez, Q. Bassat, J. J. Aponte, A. Mayor, C. E. Chitnis, P. L. Alonso, and C. Dobaño. Impact of age of first exposure to *Plasmodium falciparum* on antibody responses to malaria in children: a randomized, controlled trial in Mozambique. *Malar. J.* 2014; 13: 121.
- [163] J. K. Baird, S. Masbar, H. Basri, S. Tirtokusumo, B. Subianto, and S. L. Hoffman. Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.* 1998; 178 (2): 592–595.
- [164] J. D. Kurtis, R. Mtalib, F. K. Onyango, and P. E. Duffy. Human resistance to *Plasmodium falciparum* increases during puberty and is predicted by dehydroepiandrosterone sulfate levels. *Infect. Immun.* 2001; 69 (1): 123–128.
- [165] P. C. Bull, B. S. Lowe, M. Kortok, C. S. Molyneux, C. I. Newbold, and K. Marsh. Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Nat. Med.* 1998; 4 (3): 358–360.
- [166] B. Greenwood and G. Targett. The mysteries of immunity to malaria. *Lancet*. 2011; 377 (9779): 1729–1730.
- [167] A. Ghumra, J.-P. Semblat, R. Ataide, C. Kifude, Y. Adams, A. Claessens, D. N. Anong, P. C. Bull, C. Fennell, M. Arman, A. Amambua-Ngwa, M. Walther, D. J.

- Conway, L. Kassambara, O. K. Doumbo, A. Raza, and J. A. Rowe. Induction of strain-transcending antibodies against Group A PfEMP1 surface antigens from virulent malaria parasites. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (4): e1002665.
- [168] M. A. Nielsen, T. Staalsoe, J. A. L. Kurtzhals, B. Q. Goka, D. Dodoo, M. Alifrangis, T. G. Theander, B. D. Akanmori, and L. Hviid. *Plasmodium falciparum* variant surface antigen expression varies between isolates causing severe and nonsevere malaria and is modified by acquired immunity. *J. Immunol.* 2002; 168 (7): 3444–3450.
- [169] G. K. K. Cham, L. Turner, J. Lusingu, L. Vestergaard, B. P. Mmbando, J. D. Kurtis, A. T. R. Jensen, A. Salanti, T. Lavstsen, and T. G. Theander. Sequential, ordered acquisition of antibodies to *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 domains. *J. Immunol.* 2009; 183 (5): 3356–3363.
- [170] P. A. Magistrado, J. Lusingu, L. S. Vestergaard, M. Lemnge, T. Lavstsen, L. Turner, L. Hviid, A. T. R. Jensen, and T. G. Theander. Immunoglobulin G antibody reactivity to a group A *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 and protection from *P. falciparum* malaria. *Infect. Immun.* 2007; 75 (5): 2415–2420.
- [171] S. Gupta, R. W. Snow, C. A. Donnelly, K. Marsh, and C. Newbold. Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections. *Nat. Med.* 1999; 5 (3): 340–343.
- [172] H. A. Giha, T. Staalsoe, D. Dodoo, C. Roper, G. M. Satti, D. E. Arnot, L. Hviid, and T. G. Theander. Antibodies to variable *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte surface antigens are associated with protection from novel malaria infections. *Immunol. Lett.* 2000; 71 (2): 117–126.
- [173] L. Joergensen, L. S. Vestergaard, L. Turner, P. Magistrado, J. P. Lusingu, M. Lemnge, T. G. Theander, and A. T. R. Jensen. 3D7-Derived *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is a frequent target of naturally acquired antibodies recognizing protein domains in a particular pattern independent of malaria transmission intensity. *J. Immunol.* 2007; 178 (1): 428–435.
- [174] J. W. Mak, P. K. Lim, M. A. Tan, P. L. Lam, A. Noor Rain, G. D. Selvadurai, and K. Hanjeet. Parasitological and serological surveys for malaria among the inhabitants of an aborigine village and an adjacent Malay village. *Acta Trop.* 1987; 44 (1): 83–89.

- [175] P. Bejon, L. Turner, T. Lavstsen, G. Cham, A. Olotu, C. J. Drakeley, M. Lievens, J. Vekemans, B. Savarese, J. Lusingu, L. von Seidlein, P. C. Bull, K. Marsh, and T. G. Theander. Serological evidence of discrete spatial clusters of *Plasmodium falciparum* parasites. *PloS One*. 2011; 6 (6): e21711.
- [176] O. Bouchaud, M. Cot, S. Kony, R. Durand, R. Schiemann, P. Ralaimazava, J.-P. Coulaud, J. Le Bras, and P. Deloron. Do African immigrants living in France have long-term malarial immunity? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 72 (1): 21–25.
- [177] P. Deloron and C. Chougnet. Is immunity to malaria really short-lived? *parasitol. Today*. 1992; 8 (11): 375–378.
- [178] G. Moncunill, A. Mayor, A. Jiménez, A. Nhabomba, N. Casas-Vila, L. Puyol, J. J. Campo, M. N. Manaca, R. Aguilar, M.-J. Pinazo, M. Almirall, C. Soler, J. Muñoz, A. Bardají, E. Angov, S. Dutta, C. E. Chitnis, P. L. Alonso, J. Gascón, and C. Dobaño. High antibody responses against *Plasmodium falciparum* in immigrants after extended periods of interrupted exposure to malaria. *PloS One*. 2013; 8 (8): e73624.
- [179] F. M. Ndungu, A. Olotu, J. Mwacharo, M. Nyonda, J. Apfeld, L. K. Mramba, G. W. Fegan, P. Bejon, and K. Marsh. Memory B cells are a more reliable archive for historical antimalarial responses than plasma antibodies in no-longer exposed children. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109 (21): 8247–8252.
- [180] G. E. Weiss, F. M. Ndungu, N. McKittrick, S. Li, D. Kimani, P. D. Crompton, K. Marsh, and S. K. Pierce. High efficiency human memory B cell assay and its application to studying *Plasmodium falciparum*-specific memory B cells in natural infections. *J. Immunol. Methods*. 2012; 375 (1): 68–74.
- [181] F. M. Ndungu, K. Lundblom, J. Rono, J. Illingworth, S. Eriksson, and A. Färnert. Long-lived *Plasmodium falciparum* specific memory B cells in naturally exposed Swedish travelers. *Eur. J. Immunol.* 2013; 43 (11): 2919–2929.
- [182] S. Cohen, I. A. McGREGOR, and S. Carrington. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature*. 1961; 192: 733–737.
- [183] C. Dobaño, S. J. Rogerson, M. J. Mackinnon, D. R. Cavanagh, T. E. Taylor, M. E. Molyneux, and J. S. McBride. Differential antibody responses to *Plasmodium falciparum* merozoite proteins in Malawian children with severe malaria. *J. Infect. Dis.* 2008; 197 (5): 766–774.

- [184] T. M. Tran, A. Ongoiba, J. Coursen, C. Crosnier, A. Diouf, C.-Y. Huang, S. Li, S. Doumbo, D. Doumbo, Y. Kone, A. Bathily, S. Dia, M. Niangaly, C. Dara, J. Sangala, L. H. Miller, O. K. Doumbo, K. Kayentao, C. A. Long, K. Miura, G. J. Wright, B. Traore, and P. D. Crompton. Naturally acquired antibodies specific for Plasmodium falciparum reticulocyte-binding protein homologue 5 inhibit parasite growth and predict protection from malaria. *J. Infect. Dis.* 2014; 209 (5): 789–798.
- [185] J.-A. Chan, K. B. Howell, L. Reiling, R. Ataide, C. L. Mackintosh, F. J. I. Fowkes, M. Petter, J. M. Chesson, C. Langer, G. M. Warimwe, M. F. Duffy, S. J. Rogerson, P. C. Bull, A. F. Cowman, K. Marsh, and J. G. Beeson. Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity. *J. Clin. Invest.* 2012; 122 (9): 3227–3238.
- [186] G. M. Warimwe, M. Recker, E. W. Kiragu, C. O. Buckee, J. Wambua, J. N. Musyoki, K. Marsh, and P. C. Bull. Plasmodium falciparum var gene expression homogeneity as a marker of the host-parasite relationship under different levels of naturally acquired immunity to malaria. *PloS One.* 2013; 8 (7): e70467.
- [187] K. Marsh and S. Kinyanjui. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol.* 2006; 28 (1): 51–60.
- [188] A. Barragan, P. G. Kremsner, W. Weiss, M. Wahlgren, and J. Carlson. Age-related buildup of humoral immunity against epitopes for rosette formation and agglutination in African areas of malaria endemicity. *Infect. Immun.* 1998; 66 (10): 4783–4787.
- [189] I. Vigan-Womas, A. Lokossou, M. Guillotte, A. Juillerat, G. Bentley, A. Garcia, O. Mercereau-Puijalon, and F. Migot-Nabias. The humoral response to Plasmodium falciparum VarO rosetting variant and its association with protection against malaria in Beninese children. *Malar. J.* 2010; 9: 267.
- [190] D. Angeletti, L. Albrecht, M. Wahlgren, and K. Moll. Analysis of antibody induction upon immunization with distinct NTS-DBL1 α -domains of PfEMP1 from rosetting Plasmodium falciparum parasites. *Malar. J.* 2013; 12: 32.
- [191] A. Celada, A. Cruchaud, and L. H. Perrin. Opsonic activity of human immune serum on in vitro phagocytosis of Plasmodium falciparum infected red blood cells by monocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 1982; 47 (3): 635–644.

- [192] C. L. R. P. Yone, P. G. Kremsner, and A. J. F. Luty. Immunoglobulin G isotype responses to erythrocyte surface-expressed variant antigens of *Plasmodium falciparum* predict protection from malaria in African children. *Infect. Immun.* 2005; 73 (4): 2281–2287.
- [193] L. Hviid, T. G. Theander, Y. A. Abu-Zeid, N. H. Abdulhadi, P. H. Jakobsen, B. O. Saeed, S. Jepsen, R. A. Bayoumi, and J. B. Jensen. Loss of cellular immune reactivity during acute *Plasmodium falciparum* malaria. *FEMS Microbiol. Immunol.* 1991; 3 (4): 219–227.
- [194] A. J. Luty, S. Ulbert, B. Lell, L. Lehman, R. Schmidt-Ott, D. Luckner, B. Greve, P. Matousek, D. Schmid, K. Herbich, B. Dubois, P. Deloron, and P. G. Kremsner. Antibody responses to *Plasmodium falciparum*: evolution according to the severity of a prior clinical episode and association with subsequent reinfection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2000; 62 (5): 566–572.
- [195] A. E. Tebo, P. G. Kremsner, K. P. Piper, and A. J. F. Luty. Low antibody responses to variant surface antigens of *Plasmodium falciparum* are associated with severe malaria and increased susceptibility to malaria attacks in Gabonese children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 67 (6): 597–603.
- [196] A. Scholzen and R. W. Sauerwein. How malaria modulates memory: activation and dysregulation of B cells in *Plasmodium* infection. *Trends Parasitol.* 2013; 29 (5): 252–262.
- [197] D. Bansal, F. Herbert, P. Lim, P. Deshpande, C. Bécavin, V. Guiyedi, I. de Maria, J. C. Rousselle, A. Namane, R. Jain, P.-A. Cazenave, G. C. Mishra, C. Ferlini, C. Fesel, A. Benecke, and S. Pied. IgG autoantibody to brain beta tubulin III associated with cytokine cluster-II discriminate cerebral malaria in central India. *PloS One.* 2009; 4 (12): e8245.
- [198] E. Nduati, A. Gwela, H. Karanja, C. Mugenyi, J. Langhorne, K. Marsh, and B. C. Urban. The plasma concentration of the B cell activating factor is increased in children with acute malaria. *J. Infect. Dis.* 2011; 204 (6): 962–970.
- [199] N. Mühlberger, T. Jelinek, R. H. Behrens, I. Gjørup, J. P. Coulaud, J. Clerinx, S. Puente, G. Burchard, J. Gascon, M. P. Grobusch, T. Weitzel, T. Zoller, H. Kollaritsch, J. Beran, J. Iversen, C. Hatz, M. L. Schmid, A. Björkman, K. Fleischer, Z. Bisoffi, W. Guggemos, J. Knobloch, A. Matteelli, M. H. Schulze, H. Laferl, A. Kapaun, P. McWhinney, R. Lopez-Velez, G. Fätkenheuer, P. Kern, B. W. Zieger, A. Kotlowski, G. Fry, J. Cuadros, B. Myrvang, TropNetEurop, and Surveillance importierter Infektionen

in Deutschland Surveillance Networks. Age as a risk factor for severe manifestations and fatal outcome of falciparum malaria in European patients: observations from TropNetEurop and SIMPID Surveillance Data. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 36 (8): 990–995.

- [200] D. L. Tembo, B. Nyoni, R. V. Murikoli, M. Mukaka, D. A. Milner, M. Berriman, S. J. Rogerson, T. E. Taylor, M. E. Molyneux, W. L. Mandala, A. G. Craig, and J. Montgomery. Differential PfEMP1 expression is associated with cerebral malaria pathology. *PLoS Pathog.* 2014; 10 (12): e1004537.
- [201] M. W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (9): e45.
- [202] G. I. Bertin, A. Sabbagh, F. Guillonnet, S. Jafari-Guemouri, S. Ezinmegnon, C. Federici, B. Hounkpatin, N. Fievet, and P. Deloron. Differential protein expression profiles between Plasmodium falciparum parasites isolated from subjects presenting with pregnancy-associated malaria and uncomplicated malaria in Benin. *J. Infect. Dis.* 2013; 208 (12): 1987–1997.
- [203] T. Almelli, G. Nuel, E. Bischoff, A. Aubouy, M. Elati, C. W. Wang, M.-A. Dillies, J.-Y. Coppée, G. N. Ayissi, L. K. Basco, C. Rogier, N. T. Ndam, P. Deloron, and R. Tahar. Differences in gene transcriptomic pattern of Plasmodium falciparum in children with cerebral malaria and asymptomatic carriers. *PloS One.* 2014; 9 (12): e114401.
- [204] G. M. Warimwe, G. Fegan, E. W. Kiragu, J. N. Musyoki, A. W. Macharia, K. Marsh, T. N. Williams, and P. C. Bull. An assessment of the impact of host polymorphisms on Plasmodium falciparum var gene expression patterns among Kenyan children. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 524.
- [205] S. A. Kyes, Z. Christodoulou, A. Raza, P. Horrocks, R. Pinches, J. A. Rowe, and C. I. Newbold. A well-conserved Plasmodium falciparum var gene shows an unusual stage-specific transcript pattern. *Mol. Microbiol.* 2003; 48 (5): 1339–1348.
- [206] C. K. Y. Lau, L. Turner, J. S. Jespersen, E. D. Lowe, B. Petersen, C. W. Wang, J. E. V. Petersen, J. Lusingu, T. G. Theander, T. Lavstsen, and M. K. Higgins. Structural conservation despite huge sequence diversity allows EPCR binding by the PfEMP1 family implicated in severe childhood malaria. *Cell Host Microbe.* 2015; 17 (1): 118–129.

- [207] O. A. Erunkulu, A. V. Hill, D. P. Kwiatkowski, J. E. Todd, J. Iqbal, K. Berzins, E. M. Riley, and B. M. Greenwood. Severe malaria in Gambian children is not due to lack of previous exposure to malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 1992; 89 (2): 296–300.
- [208] Q. Zhang, Y. Zhang, Y. Huang, X. Xue, H. Yan, X. Sun, J. Wang, T. F. McCutchan, and W. Pan. From in vivo to in vitro: dynamic analysis of *Plasmodium falciparum* var gene expression patterns of patient isolates during adaptation to culture. *PLoS One.* 2011; 6 (6): e20591.
- [209] Q. Chen, A. Barragan, V. Fernandez, A. Sundström, M. Schlichtherle, A. Sahlén, J. Carlson, S. Datta, and M. Wahlgren. Identification of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) as the rosetting ligand of the malaria parasite *P. falciparum*. *J. Exp. Med.* 1998; 187 (1): 15–23.
- [210] A. Barragan, D. Spillmann, P. G. Kremsner, M. Wahlgren, and J. Carlson. *Plasmodium falciparum*: molecular background to strain-specific rosette disruption by glycosaminoglycans and sulfated glycoconjugates. *Exp. Parasitol.* 1999; 91 (2): 133–143.
- [211] A. Barragan, P. G. Kremsner, M. Wahlgren, and J. Carlson. Blood group A antigen is a coreceptor in *Plasmodium falciparum* rosetting. *Infect. Immun.* 2000; 68 (5): 2971–2975.
- [212] A. Barragan, V. Fernandez, Q. Chen, A. von Euler, M. Wahlgren, and D. Spillmann. The duffy-binding-like domain 1 of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) is a heparan sulfate ligand that requires 12 mers for binding. *Blood.* 2000; 95 (11): 3594–3599.
- [213] A. M. Vogt, A. Barragan, Q. Chen, F. Kironde, D. Spillmann, and M. Wahlgren. Heparan sulfate on endothelial cells mediates the binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes via the DBL1 α domain of PfEMP1. *Blood.* 2003; 101 (6): 2405–2411.
- [214] G. M. Warimwe, G. Fegan, J. N. Musyoki, C. R. J. C. Newton, M. Opiyo, G. Githinji, C. Andisi, F. Menza, B. Kitsao, K. Marsh, and P. C. Bull. Prognostic indicators of life-threatening malaria are associated with distinct parasite variant antigen profiles. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4 (129): 129ra45.

- [215] J. Doritchamou, S. Sossou-tchatcha, G. Cottrell, A. Moussiliou, C. Hounton Houngbeme, A. Massougbodji, P. Deloron, and N. T. Ndam. Dynamics in the cytoadherence phenotypes of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes isolated during pregnancy. *PloS One*. 2014; 9 (6): e98577.
- [216] A. Heddini, F. Pettersson, O. Kai, J. Shafi, J. Obiero, Q. Chen, A. Barragan, M. Wahlgren, and K. Marsh. Fresh isolates from children with severe *Plasmodium falciparum* malaria bind to multiple receptors. *Infect. Immun*. 2001; 69 (9): 5849–5856.
- [217] T. van der Poll. The endothelial protein C receptor and malaria. *Blood*. 2013; 122 (5): 624–625.
- [218] W. C. Aird, L. O. Mosnier, and R. M. Fairhurst. *Plasmodium falciparum* picks (on) EPCR. *Blood*. 2014; 123 (2): 163–167.
- [219] K. Schuldt, C. Ehmen, J. Evans, J. May, D. Ansong, J. Sievertsen, B. Muntau, G. Ruge, T. Agbenyega, and R. D. Horstmann. Endothelial protein C receptor gene variants not associated with severe malaria in Ghanaian children. *PloS One*. 2014; 9 (12): e115770.
- [220] I. Naka, J. Patarapotikul, H. Hananantachai, H. Imai, and J. Ohashi. Association of the endothelial protein C receptor (PROCR) rs867186-G allele with protection from severe malaria. *Malar. J.* 2014; 13: 105.
- [221] M. Ho. EPCR: holy grail of malaria cytoadhesion? *Blood*. 2014; 123 (2): 157–159.
- [222] D. Angeletti, T. Sandalova, M. Wahlgren, and A. Achour. Binding of Subdomains 1/2 of PfEMP1-DBL1 α to Heparan Sulfate or Heparin Mediates *Plasmodium falciparum* Rosetting. *PloS One*. 2015; 10 (3): e0118898.
- [223] M. R. Agrawal, A. D. Ozarkar, S. Gupta, D. N. Deobagkar, and D. D. Deobagkar. Comparative study of *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1-DBL α domain variants with respect to antigenic variations and docking interaction analysis with glycosaminoglycans. *Mol. Biosyst.* 2014; 10 (9): 2466–2479.
- [224] A. Mayor, E. Rovira-Vallbona, A. Srivastava, S. K. Sharma, S. S. Pati, L. Puyol, L. Quinto, Q. Bassat, S. Machevo, I. Mandomando, V. S. Chauhan, P. L. Alonso, and C. E. Chitnis. Functional and immunological characterization of a Duffy binding-like alpha

domain from *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 that mediates resetting. *Infect. Immun.* 2009; 77 (9): 3857–3863.

- [225] L. Albrecht, D. Angeletti, K. Moll, K. Blomqvist, D. Valentini, F. L. D’Alexandri, M. Maurer, and M. Wahlgren. B-cell epitopes in NTS-DBL1 α of PfEMP1 recognized by human antibodies in Rosetting *Plasmodium falciparum*. *PloS One.* 2014; 9 (12): e113248.
- [226] A. M. Leitgeb, K. Blomqvist, F. Cho-Ngwa, M. Samje, P. Nde, V. Titanji, and M. Wahlgren. Low anticoagulant heparin disrupts *Plasmodium falciparum* rosettes in fresh clinical isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 84 (3): 390–396.
- [227] M. Avril, A. J. Brazier, M. Melcher, S. Sampath, and J. D. Smith. DC8 and DC13 var genes associated with severe malaria bind avidly to diverse endothelial cells. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (6): e1003430.
- [228] T. Pistone, A. Diallo, M. Mechain, M.-C. Receveur, and D. Malvy. Epidemiology of imported malaria give support to the hypothesis of ‘long-term’ semi-immunity to malaria in sub-Saharan African migrants living in France. *Travel Med. Infect. Dis.* 2014; 12 (1): 48-53.
- [229] B. Adhikari, N. Tangpukdee, S. Krudsood, and P. Wilairatana. Factors associated with cerebral malaria. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2013; 44 (6): 941–949.
- [230] B. J. Arnold, N. Tangpukdee, S. Krudsood, and P. Wilairatana. Risk factors of shock in severe falciparum malaria. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2013; 44 (4): 541–550.
- [231] K. K. Y. K. Win, V. Thanachartwet, Y. Wattanagoon, S. Jerraksuwan, R. Ruangweerayut, and V. Desakorn. Factors associated with acute renal failure in adults with severe falciparum malaria. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2012; 43 (5): 1071–1079.
- [232] P. N. Newton, K. Stepniwska, A. Dondorp, K. Silamut, W. Chierakul, S. Krishna, T. M. E. Davis, Y. Suputtamongkol, B. Angus, S. Pukrittayakamee, R. Ruangveerayuth, J. Hanson, N. P. J. Day, and N. J. White. Prognostic indicators in adults hospitalized with falciparum malaria in Western Thailand. *Malar. J.* 2013; 12: 229.

- [233] P. Sagaki, V. Thanachartwet, V. Desakorn, D. Sahassananda, S. Chamnanchanunt, W. Chierakul, P. Pitisuttithum, and P. Ruangchanasetr. Clinical factors for severity of *Plasmodium falciparum* malaria in hospitalized adults in Thailand. *PloS One*. 2013; 8 (8): e71503.
- [234] C. Cotter, H. J. W. Sturrock, M. S. Hsiang, J. Liu, A. A. Phillips, J. Hwang, C. S. Gueye, N. Fullman, R. D. Gosling, and R. G. A. Feachem. The changing epidemiology of malaria elimination: new strategies for new challenges. *Lancet*. 2013; 382 (9895): 900–911.