



HAL
open science

Analyse du système hôte-parasite chez le patient pour un traitement adapté du neuropaludisme

Koffi Bertin Vianou

► **To cite this version:**

Koffi Bertin Vianou. Analyse du système hôte-parasite chez le patient pour un traitement adapté du neuropaludisme. Sciences agricoles. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSES008 . tel-04594173

HAL Id: tel-04594173

<https://theses.hal.science/tel-04594173v1>

Submitted on 30 May 2024

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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Analyse du système hôte-parasite chez le patient pour un
traitement adapté du neuropaludisme

Thèse présentée et soutenue, le 6 mars 2024 par

Koffi Bertin VIANOU

École doctorale

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité

PHYSIOPATHOLOGIE

Unité de recherche

PHARMA-DEV -Laboratoire Pharmacochimie et Pharmacologie pour le Développement

Thèse dirigée par

Agnes AUBOUY et Akadiri YESSOUFOU

Composition du jury

M. David COURTIN, Rapporteur, IRD Paris

M. Adrian LUTY, Rapporteur, IRD Paris

M. Tomabu Gbèdomidji ADJOBIMEY, Examineur, Universität Bonn

Mme Karine REYBIER, Examinatrice, Université Toulouse - Paul Sabatier

Mme Agnes AUBOUY, Directrice de thèse, IRD Occitanie

M. Akadiri YESSOUFOU, Co-directeur de thèse, Université d'Abomey-Calavi

RESUME

Analyse du système hôte-parasite chez le patient pour un traitement adapté du neuropaludisme

Le neuropaludisme, complication neurologique mortelle du paludisme à *Plasmodium falciparum*, survient principalement chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique subsaharienne. Malgré un traitement à l'artésunate intraveineux, la mortalité reste élevée. Une meilleure connaissance de la physiopathologie du neuropaludisme permettra donc d'envisager de nouveaux types de traitements plus adaptés.

Une cohorte d'enfants béninois présentant soit un paludisme simple (UM), soit un neuropaludisme (CM) a été constituée. Les enfants présentant un CM ont fait l'objet d'un suivi à trois jours et un mois (J3, J30) après leur inclusion dans l'étude (J0). Ce travail de thèse a porté sur trois aspects de la réponse de l'hôte au travers des questions suivantes : 1) l'activation endothéliale est-elle impactée par le type de parasite infectant ? ; 2) la réponse monocyttaire est-elle affectée au cours du neuropaludisme ? et ; 3) peut-on identifier des biomarqueurs spécifiques de la survenue du décès au cours du neuropaludisme ?

En utilisant un modèle de co-culture (Hbec-5i et globules rouges infectés – GRi – issus des patients), nous avons montré par RT-qPCR que la cytoadhérence des globules rouges parasités, issus d'enfants souffrant de CM, aux CE augmentait le niveau d'expression du gène *Nrf2* sur ces dernières. La comparaison entre groupes cliniques (CM et UM) des biomarqueurs d'activation endothéliale mesurés dans les surnageants de co-culture (avec ou sans contact entre les deux types cellulaires) n'a montré aucune différence significative. Ces résultats suggèrent que la cytoadhérence des GRi aux CE ne suffit pas à elle seule à induire la production de biomarqueurs d'activation par les CE.

Concernant l'impact du neuropaludisme sur la réponse monocyttaire, les résultats ont montré une diminution de la proportion des monocytes non-classiques et une altération de la capacité de phagocytose des monocytes totaux au cours de la phase aiguë du neuropaludisme (J0), suivie d'un retour à une répartition normale à J3 puis J30. Les monocytes non-classiques ont montré une meilleure capacité de phagocytose opsonique et non-opsonique comparée à la capacité des monocytes classiques et intermédiaires. L'étude du profil transcriptionnel des monocytes a révélé que la sévérité du paludisme était associée à une altération de l'expression des gènes *CD16*, *CRI*, *CR3*, *TLR2*, impliqués dans la phagocytose opsonique, et de *Tim3*, impliqué dans

la modulation de la clairance parasitaire. Ces résultats suggèrent que les monocytes non-classiques sont des acteurs clés de la réponse immune mise en place au cours du neuropaludisme et que la fonction des monocytes serait contrôlée au niveau transcriptomique. Des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier l'origine de ces mécanismes de contrôle.

Enfin, des biomarqueurs plasmatiques et urinaires ont été mesurés chez les enfants souffrant d'un neuropaludisme. L'analyse univariée a révélé des associations entre la survenue du décès par neuropaludisme et des taux plasmatiques élevés de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-8 , IL-10 , CXCL9 , Granzyme B, angiopoïétine-2 et des taux faibles de PGEM urinaire. Après une analyse en régression logistique multivariée, l' IL-8 est apparue comme fortement associée à la survenue de décès pour une concentration plasmatique ≥ 57.5 pg/mL à J0 suivi d'une rapide diminution à J3 et J30 chez les enfants survivants. La cinétique des biomarqueurs (J0, J3, J30) a permis de distinguer un profil d'aggravation de la maladie d'une part et un profil de résolution d'autre part.

Ces travaux révèlent que le neuropaludisme engendre une activation de la réponse antioxydante par l'endothélium vasculaire, ainsi qu'une altération de la réponse monocyttaire via la diminution de la capacité des monocytes non-classiques à éliminer les GRi par phagocytose. En outre, l' IL-8 comme biomarqueur associé au décès souligne également l'importance de la réponse neutrophile au cours du neuropaludisme.

ABSTRACT

Analysis of host-parasite interaction in cerebral malaria patients for appropriate treatment

Cerebral malaria, a fatal neurological complication of *Plasmodium falciparum* infection, occurs mainly in children under the age of five in sub-Saharan Africa. Despite treatment with intravenous artesunate, mortality remains high. A better understanding of the pathophysiology of cerebral malaria will enable us to envisage new, more suitable types of treatment.

A cohort of Beninese children presenting with either uncomplicated malaria (UM) or cerebral malaria (CM) was set up. Children with CM were followed up at three days and 1 month (D3, D30) after their inclusion in the study (D0). This thesis focused on three aspects of the host response through the following questions: 1) Is endothelial activation impacted by the type of parasite infecting the host? 2) Is the monocyte response affected during cerebral malaria? and 3) Can we identify specific biomarkers of death during cerebral malaria?

Using a co-culture model (Hbec-5i and infected red blood cells -iRBCs- from patients), we showed by RT-qPCR that cytoadherence of infected red blood cells from children with CM to endothelial cells increased the expression level of the *Nrf2* gene on the endothelial cells. Comparison between clinical groups (CM and UM) of endothelial activation biomarkers measured in co-culture supernatants (with or without contact between the two cell types) showed no significant difference. These results suggest that cytoadherence of iRBCs to ECs alone is not sufficient to induce the production of activation biomarkers by ECs.

Concerning the impact of cerebral malaria on monocyte response, the results showed a decrease in the proportion of non-classical monocytes and an alteration in the phagocytosis capacity of total monocytes during acute cerebral malaria (D0), followed by a return to a normal distribution at D3 and then D30. Non-classical monocytes showed a better opsonic and non-opsonic phagocytosis capacity compared with the phagocytosis capacity of the classical and intermediate monocytes. Transcriptional profiling of monocytes revealed that malaria severity was associated with altered expression of *CD16*, *CR1*, *CR3*, *TLR2*, involved in opsonic phagocytosis, and *Tim3*, involved in modulating parasite clearance. These results suggest that non-classical monocytes play a key role in the immune response set up during cerebral malaria, and that monocyte function would be controlled at the transcriptomic level. Further studies are required to identify the origin of these control mechanisms.

Finally, plasma and urinary biomarkers were measured in children suffering from cerebral malaria. Univariate analysis revealed associations between the occurrence of death from CM and elevated plasma levels of TNF α , IL-1 β , IL-10, CXCL9, Granzyme B, angiopoietin-2 and low levels of urinary PGEM. After multivariate logistic regression analysis, IL-8 appeared to be strongly associated with the occurrence of death for a plasma concentration ≥ 57.5 pg/mL at D0 followed by a rapid decreasing at D3 and D30 in surviving children. Biomarkers kinetics (D0, D3, D30) enabled us to distinguish a marker profiles of disease aggravation and resolution.

This work reveals that cerebral malaria generates an activation of the antioxidant response by the vascular endothelium, as well as an alteration of the monocyte response via the diminished capacity of non-classical monocytes to eliminate iRBCs by phagocytosis. Furthermore, IL-8 as a biomarker associated with death also underlines the importance of the neutrophil response during cerebral malaria.

A mon père qui a tant souhaité voir ce jour...

Le 14 Juin 2021 pendant que je venais m'enquérir des nouvelles
de ton état de santé, tu m'as laissé le message suivant :

***« Je me porte bien ici. J'assisterai à ta soutenance en 2023 avec mention honorable en
personne. C'est mon vœu. Porte-toi bien. ».***

Malheureusement, cette maladie ne t'a pas laissé la chance
de voir ce jour que tu as tant souhaité.

Tes appels, encouragements et soutiens de tous genres même dans la maladie
m'ont donné la force d'accomplir ce travail.

REMERCIEMENTS

Il aurait été impossible d'accomplir ce travail de recherche sans le soutien et l'aide de gens aimables.

Je souhaite en premier lieu exprimer ma gratitude à ma directrice de thèse, **Dr Agnès AUBOUY** pour m'avoir donné l'occasion de faire ce fascinant travail de recherche. Je lui suis également reconnaissant pour le temps conséquent qu'elle m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa sympathie. Plus important encore, elle m'a conseillé dans toutes les situations difficiles et m'a motivé chaque fois que je manquais d'inspiration. Je l'admire vraiment pour la liberté qu'elle m'a donnée de mener des recherches indépendantes tout en étant incontestablement présente à mes côtés. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Je voudrais aussi exprimer toute ma reconnaissance au **professeur Akadiri YESSOUFOU** pour avoir accepté co-diriger cette thèse. Cher professeur, je vous prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Ma reconnaissance va également au **Dr Gwladys Bertin** qui m'a soutenue tout au long de mes recherches. Elle m'a continuellement encouragé et a toujours été disposée et enthousiaste à m'aider de quelque manière que ce soit et à tout moment. Son aide m'a permis de m'intégrer rapidement dans l'équipe NeuroCM. Ma gratitude va également au **Dr Nicolas Argy** pour son encadrement depuis le Master2 jusqu'à la thèse.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude aux rapporteurs de ma thèse : le **Dr Adrian Luty** et le **Dr David Courtin**. J'apprécie profondément le temps précieux qu'ils ont consacré à la lecture de ma thèse. Leurs commentaires et suggestions utiles, m'ont permis d'améliorer la qualité de ce travail.

Je remercie le **Professeur Karine Reybier** qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse et le **Dr Tomabu Adjobimey** pour avoir accepté examiner ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur **Antoine Berry**, PU-PH au Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan et madame **Célia Dechavanne**, Chargée de recherche à l'IRD, membres de mon comité de suivi individuel (CSI), pour leur accompagnement malgré leurs multiples occupations.

A mes collègues de **IRCB/CERPAGE/UMR261**, j'exprime mes sincères remerciements pour toutes ces années de travail en équipe.

En outre, je voudrais remercier tous mes collègues de **Pharmadev**, Toulouse et de **MERIT**, Paris. Je serai toujours reconnaissant pour votre aimable aide.

Merci également à **Firmine** et **Sophie** pour tous ces moments de rigolade. Nos taquineries étaient pour moi de véritables instants de détente. Je ne peux m'empêcher de repenser à toutes nos discussions et blagues. MERCI pour tous ces instants de vie, simples et sincères.

Ma gratitude va à mes amis **Raymond**, **Astride**, **Joao**, **Evincia** et **William** (mon Associé). Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu et encouragé à franchir cette nouvelle étape de ma vie.

J'adresse mes chaleureux remerciements au **Dr Jade Royo** pour toute son aide. Je me rappelle encore de ce 21 mars 2023 (jour du décès de mon papa), pendant que je me suis caché pour vider les larmes de mon corps, tu m'as cherché et trouvé. Ta sollicitude m'a permis de passer ces moments de douleurs. Un grand MERCI pour ton amitié et une belle pensée pour **Thomas** et la princesse **Thaïs**.

Je tiens à remercier l'Institut de Recherche pour le Développement (l'IRD) pour la bourse de doctorat qu'il m'a accordée à travers le programme ARTS (Allocations de recherche pour une thèse au Sud).

Mon profond amour à **Elonm**, **Essénam**, **Elékoum** et **Enam**. Que ce travail soit pour vous la preuve que tout est possible avec la volonté. Merci d'avoir accepté passer ces longs mois à la maison sans ma présence physique.

Enfin, mes plus grands remerciements vont à mon épouse **Romelle** qui a toujours pris soin de moi et m'a apporté un soutien constant pendant mon doctorat. Merci pour les innombrables fois où tu as fait des pieds et des mains pour t'assurer que j'étais à l'aise et pour tous les compromis que tu as faits. Tu es vraiment une femme vertueuse et le mot "MERCI" est bien faible pour tout ce que tu as fait et continues de faire pour moi. Puisse la fin de cette thèse nous permettre d'ouvrir un chapitre nouveau et extraordinaire de notre vie.

*A tous ceux que je n'ai pas cité,
Merci de m'avoir soutenu. Je ne l'ai jamais assez apprécié.
Je vous souhaite beaucoup de succès parce que vous le méritez.*

"The parasite has been killing children, injuring children, and sapping the strength of
whole populations for tens of thousands of years...

Now, we can chart a course to end it.

" Bill Gates, 2011"

LISTE DES PUBLICATIONS

ARTICLE I

Vianou B, L. Houzé, J. Fraering, IM Gomez, V. Joste, B. Palmier, C. Guerin, E. Guillochon, J.F. Faucher, S. Houzé, G. Cottrell, A. Aubouy, G.I. Bertin, N. Argy and NeuroCM group. Activation phenotype of HBEC-5i cells following co-culture with *P. falciparum*-infected erythrocyte isolates from children with cerebral malaria. (En préparation)

ARTICLE II

Vianou B, Royo J, Dechavanne S, Bertin G I, Yessoufou A, Houze S, Faucher J F & Aubouy A, and NeuroCM group. Monocytes and particularly non-classical ones lose their opsonic and non-opsonic phagocytosis capacity during pediatric cerebral malaria. (En révision à *Frontiers in Immunology*)

ARTICLE III

Royo J, **Vianou B**, Accrombessi M, Kinkpé E, Ayédadjou L, Dossou-Dagba I, Yélé Ladipo, J A Maroufou, Bertin G I, Cot M, Boumédiène F, Houzé S, Faucher J F, Aubouy A and NeuroCM Group. Elevated plasma interleukin-8 as a risk factor for mortality in children presenting with cerebral malaria. *Infectious Diseases of Poverty*. 9 févr 2023;12(1):8.

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degré Celsius
ADN	Acide Désoxyribonucléique
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
CD	Cluster de Différentiation
CIDRs	Cysteine-rich interdomain regions
CM	Cerebral malaria = Neuropaludisme
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPAg	Cellules présentatrices d'antigène
CSA	Chondroïtin Sulphate A
CTA	Combinaisons Thérapeutiques à base des dérivés de l'Artémisinine
DBL	Domaines Duffy-binding-like
ECM	Experimental cerebral malaria = neuropaludisme expérimental
EPCR	Endothelial Protein C Receptor
FcγR	Fc gamma receptors
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRi	Globules Rouges infectés
Hb	Hémoglobine
HRP2	Histidine rich protein 2
Hte	Hématocrite
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleukine
KAHRP	Knob associated histine rich protein
MESA	Mature parasite infected erythrocyte surface antigen
MII	Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide
NETs	Neutrophil extracellular traps
NFκB	Nuclear factor Kappa B
NK	Natural killer
NO	Nitric oxyde
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
ODD	Objectifs de Développement Durable
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

<i>P.f</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>P.k</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>P.m</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>P.o</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>P.v</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase chain reaction
PECAM1	Platelet endothelial cell adhesion molecule1
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protéine 1
PfHRP2	<i>Plasmodium falciparum</i> histidine rich protein 2
PGE2/PGEM	Prostaglandine E2, Métabolites de la PGE2
PPAR γ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor (gamma)
PRR	Pattern recognition receptor
PVVIH	Personnes vivant avec le VIH
RESA	Ring infected erythrocyte surface antigen
RNI	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SICA	Schizont Infected Cell Agglutination
SMA	Severe malarial anaemia = Anémie sévère palustre
SNC	Système nerveux central
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TDR	Tests de Diagnostic Rapide
TLR	Toll Like receptor
TNF α	Tumour Necrosis Factor alpha
UM	Uncomplicated malaria = Accès palustre simple
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VSA	Variant surface antigen
vWF	Facteur de von Willebrand

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Carte de la répartition du paludisme dans le monde, selon le niveau de transmission

Figure 2 : Schéma anatomique de *Plasmodium falciparum*

Figure 3 : Anophèle femelle (vecteur du paludisme)

Figure 4 : Cycle de vie de *P. falciparum* chez l'homme et le moustique

Figure 5 : Présentation de PfEMP1 sur des knobs à la surface du GRi

Figure 6 : Gènes *var* et structure de PfEMP1

Figure 7 : Phénomènes de séquestration parasitaire et de rosetting dans les microvaisseaux cérébraux

Figure 8 : Structure de la barrière hémato-encéphalique

Figure 9 : Mécanismes moléculaires du dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique

Figure 10 : Résumé schématique de la pathologie du paludisme cérébral

Figure 11 : Rôle des monocytes dans la protection contre le paludisme

Figure 12 : Les sources du stress oxydatif au cours du paludisme

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des sous-populations monocytaires

Tableau 2 : Les manifestations cliniques du neuropaludisme chez l'enfant et l'adulte

Tableau 3 : Liste des essais cliniques randomisés sur les traitements d'appoint dans les cas de neuropaludisme

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ii
LISTE DES PUBLICATIONS.....	v
LISTE DES ABREVIATIONS.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
INTRODUCTION.....	1
PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I- Données générales sur le paludisme.....	4
1. Le paludisme.....	4
1.1. Historique.....	4
1.2. Épidémiologie.....	6
2. Parasite et agent vecteur.....	10
2.1. Agent pathogène.....	10
2.1.1. <i>Plasmodium falciparum</i>	11
2.1.2. <i>Plasmodium vivax</i>	12
2.1.3. <i>Plasmodium ovale</i>	12
2.1.4. <i>Plasmodium malariae</i>	13
2.1.5. <i>Plasmodium knowlesi</i>	13
2.2. Agents vecteurs.....	14
3. Cycle de développement de <i>P. falciparum</i>.....	15
3.1. Cycle asexué chez l'homme.....	16
3.2. Cycle sexué chez le moustique.....	16
4. Formes cliniques de paludisme.....	17
4.1. L'accès simple.....	18
4.2. Paludisme grave.....	19
4.2.1. Le neuropaludisme.....	20
4.2.2. Paludisme associé à la grossesse.....	21
4.2.3. Autres formes de paludisme grave.....	22
II. Le neuropaludisme.....	22
1. Physiopathologie du neuropaludisme.....	22
1.1. Les parasites et le phénomène de séquestration.....	22
1.1.1. Rôle de <i>PfEMP1</i> et gènes var dans la cytoadhérence des globules rouges infectés.....	25
1.1.1.1. Structure de <i>PfEMP1</i>	25
1.1.1.2. Rôle de <i>PfEMP1</i>	27
1.1.2. Phénomène de rosetting.....	28
1.1.3. Rôle des plaquettes dans la cytoadhérence des globules rouges infectés.....	29
1.2. Activation de l'endothélium cérébral et rôle des cellules endothéliales.....	31
1.2.1. Les cellules endothéliales.....	31
1.2.2. La barrière hémato-encéphalique (BHE).....	31
1.2.3. Activation de l'endothélium cérébral.....	32

1.3.	Rupture de la barrière hémato-encéphalique	35
1.4.	Synthèse de la physiopathologie du neuropaludisme	37
2.	<i>Le rôle des monocytes dans la pathogenèse du neuropaludisme.....</i>	38
2.1.	Les trois sous-populations de monocytes	39
2.1.1.	Les monocytes classiques	39
2.1.2.	Les monocytes intermédiaires.....	40
2.1.3.	Les monocytes non-classiques	41
2.2.	Rôle des monocytes dans la pathologie du neuropaludisme	42
2.2.1.	La phagocytose	44
2.2.1.1.	La phagocytose non-opsonique	46
2.2.1.2.	La phagocytose opsonique	47
2.2.2.	Inhibition à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCI).....	48
2.2.3.	La production de cytokines	49
2.2.4.	La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de dérivés nitrés (RNI).....	50
3.	<i>Manifestations cliniques du neuropaludisme</i>	54
4.	<i>Marqueurs biologiques du neuropaludisme</i>	56
4.1.	ICAM-1 soluble.....	56
4.2.	EPCR soluble.....	56
4.3.	Rapport Ang-2/Ang-1	57
4.4.	Autres biomarqueurs pronostiques	58
5.	<i>Approches thérapeutiques du neuropaludisme.....</i>	58
5.1.	Thérapie antipaludique	58
5.2.	Thérapies adjuvantes potentielles.....	59
5.3.	Thérapies adjuvantes ciblant les monocytes.....	62
III.	<i>Problématique.....</i>	66
PARTIE 2 : TRAVAUX DE RECHERCHE.....		69
I-	<i>Étude des médiateurs de l'activation de la réponse endothéliale lors d'une infection palustre</i>	71
1.	Introduction	71
2.	Activation phenotype of the endothelial cell line HBEC-5i following coculture between infected red blood cells by cerebral malaria isolates and endothelial cells.....	72
2.1.	Résumé.....	72
2.2.	Article I	73
II-	<i>Étude de la réponse monocyttaire des patients présentant un neuropaludisme.....</i>	101
1.	Introduction	101
2.	Monocytes and particularly non-classical ones lose their opsonic and non-opsonic phagocytosis capacity during pediatric cerebral malaria	102
2.1.	Résumé.....	102
2.2.	Article II.....	103
III-	<i>Identification des marqueurs plasmatiques et urinaires du risque de neuropaludisme et de décès</i>	129
1.	Introduction	129

2. Elevated plasma interleukin-8 as a risk factor for mortality in children presenting with cerebral malaria	129
2.1. Résumé.....	129
2.2. Article III.....	131
<i>IV- Discussion générale</i>	146
<i>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</i>	159
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	162
<i>ANNEXES</i>	187
1. Protocole de phagocytose	187
2. Article sur le protocole du projet NeuroCM.....	194

INTRODUCTION

Le fardeau du paludisme a été considérablement réduit au cours de la dernière décennie, en partie grâce à la mise en œuvre de combinaisons thérapeutiques à base d'artémisinine (CTA) et d'autres interventions visant à contrôler et, à terme, à éliminer le paludisme (1). Les taux de mortalité dus au paludisme ont été réduits de plus d'un quart dans le monde et d'un tiers dans la région Africaine de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Toutefois, la transmission du paludisme se poursuit dans 99 pays et selon le rapport 2023 de l'OMS sur le paludisme dans le monde, les estimations font état de 249 millions de cas de paludisme en 2022 contre 247 millions en 2021 (2). Dans les pays où la transmission est permanente, le paludisme reste un problème de santé publique majeur avec 608 000 personnes décédées dans le monde du paludisme en 2022 contre 619 000 en 2021 (2,3).

Des cinq espèces de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*) pouvant parasiter l'homme, la grande majorité de la morbidité et de la mortalité dues au paludisme est causée par une infection à *P. falciparum* (4). L'infection à *P. falciparum* peut conduire à diverses pathologies dont les formes les plus graves sont l'anémie sévère palustre et le neuropaludisme (ou paludisme cérébral). Elle provoque près d'un quart des décès d'enfants en Afrique subsaharienne. Le paludisme sévère survient principalement chez des patients non immunisés et 90% des cas de paludisme grave touchent les enfants âgés de 0 à 5 ans en Afrique sub-saharienne (4). Parmi les autres groupes à haut risque, on retrouve également les femmes enceintes, les personnes âgées et les adultes non immunisés (voyageurs). Le neuropaludisme est un syndrome de paludisme grave à *P. falciparum* avec une mortalité d'environ 25 %, causé par les interactions entre l'hôte et le parasite. Il affecte le système nerveux central, provoquant des déficits neurologiques et des séquelles cognitives (5).

La réponse immunitaire innée lors d'une infection à *P. falciparum* au stade sanguin fait intervenir les neutrophiles, les cellules dendritiques, les lymphocytes « natural killer », les cellules endothéliales et les monocytes (6), ces derniers jouant un rôle important dans la réponse pro-inflammatoire (7). Les monocytes font partie des cellules essentielles à la réponse immune précoce dans le paludisme et constituent l'une des premières barrières immunitaires capable de limiter la parasitémie par phagocytose. Ils jouent aussi un rôle clé dans la modulation des balances pro/anti-inflammatoire et pro/antioxydante, indispensables à la résolution du neuropaludisme. Entre autres cellules essentielles, les cellules endothéliales

constituent la barrière protectrice des capillaires cérébraux, la barrière hémato-encéphalique, dont l'activation initie la réaction inflammatoire locale.

Les difficultés de mise au point d'un vaccin associées à l'émergence de souches résistantes aux antipaludiques rendent fragiles les mesures prises par le système de santé publique. Aussi, le fait qu'un individu développe un paludisme asymptomatique, simple ou grave dépend de l'équilibre entre l'immunité protectrice et l'immunopathologie. Cependant, les facteurs qui orientent l'immunité de l'hôte vers la protection ou la pathologie ne sont pas bien compris. Un approfondissement des connaissances sur les interactions hôte-parasites et les mécanismes de défense mis en œuvre par l'hôte au cours de l'infection à *P. falciparum* pourrait permettre d'améliorer la prise en charge et la conception de nouveaux agents immunothérapeutiques.

PARTIE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Données générales sur le paludisme

1. Le paludisme

Le paludisme, encore appelé malaria, est une infection parasitaire vectorielle présente dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique du Sud, d'Afrique Subsaharienne et d'Asie du Sud-Est. Véritable fléau, la région Afrique de l'OMS reste la plus durement touchée par la maladie avec 233 millions de cas de paludisme estimés et 580 000 décès dus au paludisme en 2022 (94 % des cas et 95 % des décès au niveau mondial) (2). Le paludisme menace 40% de la population mondiale dans quelques 90 pays. Le microorganisme responsable du paludisme est un protozoaire hématozoaire appartenant au Phylum des *Apicomplexa*, du genre *Plasmodium*, dont cinq espèces peuvent parasiter l'homme (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*). L'infection à *Plasmodium* chez l'homme est à l'origine de diverses manifestations cliniques allant de l'infection asymptomatique au neuropaludisme en passant par le paludisme simple et l'anémie sévère palustre. Le paludisme constitue encore un problème majeur de santé publique malgré les progrès considérables effectués au cours des dix dernières années dans la lutte contre *Plasmodium*.

1.1.Historique

L'histoire du paludisme s'étend de son origine préhistorique en tant que maladie zoonotique chez les primates d'Afrique jusqu'au XXI^{ème} siècle. Au IV^{ème} siècle avant Jésus Christ, les premières descriptions du paludisme furent établies par Hippocrate. Dans « Le Livre des Epidémies » et « Consultations », il établit une corrélation entre la présence de marécages et les crises fébriles de périodicités variables observées chez certains patients. Le nom paludisme tire ainsi son origine de cette observation et est dérivé du latin palus, paludis, qui signifie « marais », et malaria (sa dénomination anglophone) de l'italien mal-aria ou « "mauvais air" en italien médiéval » car se transmettant dans les régions humides (8).

Cinq cent ans plus tard, Celsus établit les premières différences entre les symptômes cliniques du paludisme à *P. malariae*, *P. vivax* et *P. falciparum*. Maladie infectieuse humaine répandue et potentiellement mortelle, le paludisme, à son apogée, infestait tous les continents, à l'exception de l'Antarctique. La découverte de l'existence du *Plasmodium* dans des moustiques âgés d'environ 30 millions d'années conservés dans l'ambre de la période paléogène et des traces d'ADN de *P. falciparum* sur des momies égyptiennes datant de moins 3000 ans avant Jésus Christ notamment sur celle de Toutankhamon constituent les premières preuves de l'existence de parasites du paludisme (9). Les méthodes moléculaires ont ensuite confirmé la

prévalence du paludisme dans l'Égypte ancienne depuis environ 800 ans avant Jésus Christ. Les grandes découvertes et le commerce d'esclaves africains lui ont permis de s'installer sur le continent américain dès le XVIème siècle après Jésus Christ (10). À la fin du XXe siècle, le paludisme était encore endémique dans plus de 100 pays des zones tropicales et subtropicales, y compris en Amérique centrale et du Sud (Haïti et la République dominicaine), en Afrique, au Moyen-Orient, dans le sous-continent indien, en Asie du Sud-Est et en Océanie.

En 1848, dans le sang et la rate d'un patient décédé, l'allemand Johann Heinrich Meckel observait sans s'en rendre compte des parasites du paludisme sous forme de granules de pigment noir-brun, qu'il a attribué à de la mélanine. En 1880, le médecin français Charles Louis Alphonse Laveran a observé des parasites pigmentés à l'intérieur des globules rouges de malades du paludisme lorsqu'il travaillait à l'hôpital militaire de Constantine en Algérie. Étant témoin des événements d'exflagellation, Laveran était convaincu d'être en présence de micro-organismes parasités. Il a aussi noté que la quinine éliminait les parasites du sang. Laveran a nommé cet organisme microscopique *Oscillaria malariae* et a proposé que le paludisme est causé par ce protozoaire. Cependant, cette découverte est restée sujet à controverse jusqu'au développement de la lentille à immersion d'huile en 1884 et des méthodes de coloration adaptées pour la mise en évidence des globules rouges infectés par *Plasmodium* en 1890–1891 (11).

Concernant les différentes espèces plasmodiales, ce sont les travaux de Ettore Marchiafava, Angelo Celli et Camillo Golgi qui ont permis d'en faire la distinction. En 1885, Golgi a notamment observé que les parasites présents dans le sang humain se divisaient à intervalles réguliers et de façon quasi simultanée et que cette division coïncidait avec des accès de fièvre. La distinction entre *P. vivax* et *P. malariae* a été rendue possible en 1886 lorsque Golgi a décrit les différences morphologiques entre ces deux espèces. En 1889 et 1890, Sakharov et Marchiafava & Celli ont chacun identifié *P. falciparum* comme une espèce distincte de *P. vivax* et *P. malariae*. En 1892, Marchiafava et Bignami ont prouvé l'appartenance des multiples formes vues par Laveran à une seule espèce : *P. falciparum*. En reconnaissance de ses travaux sur le rôle joué par les protozoaires dans l'apparition de maladies, Laveran a reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1907 (12). Concernant le cycle de développement du parasite, le médecin néerlandais Pieter Pel a proposé en 1886 un stade tissulaire de *Plasmodium*, et a soutenu la théorie de la phase latente de Golgi en 1896 (13). Il faudra cependant attendre les années 1980 pour avoir la description du cycle complet de *Plasmodium* et 2004 pour qu'une cinquième espèce, *P. knowlesi*, également responsable d'infections humaines, soit reconnue.

En 1630, la découverte des racines de quinquina, importées en Europe du Pérou par Don Francisco Lopez sont les premiers vrais traitements de la maladie. Ce n'est qu'en 1820 que les pharmaciens J. Pelletier et J.B. Caventou réussissent à isoler le principe actif de la plante, la quinine. C'est le début de l'ère de la chimiothérapie. La quinine est aujourd'hui obtenue par hémi-synthèse chimique. Au milieu du XXème siècle, les antipaludiques de synthèse comme la chloroquine sont développés, de même que de nouvelles stratégies de lutte antivectorielle impliquant l'utilisation d'insecticides comme le DDT (Dichloro Diphényl Trichloro-éthane). Malheureusement, les premières résistances du parasite aux traitements et des moustiques aux insecticides apparaissent seulement quelques années plus tard. Il faudra attendre 1972 pour que les propriétés antipaludiques de l'artémisinine, une molécule issue d'une plante chinoise appelée Qinghao (*Artemisia annua*) soient mises en évidence. De nouveaux traitements appelés Combinaisons Thérapeutiques à base des dérivés de l'Artémisinine (CTA) seront mis en place dans les années 90. Mais des parasites résistants à ces traitements sont apparus en Asie une vingtaine d'années plus tard et très récemment en Afrique (14).

1.2. Épidémiologie

Le paludisme reste l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde en développement malgré les récentes réductions de l'incidence globale des cas de paludisme. Estimé dans le monde à 249 millions de cas en 2022, 247 millions en 2021, 245 millions en 2020 et 232 millions en 2019, la région Afrique de l'OMS reste la plus durement touchée par le paludisme (95 % des cas et 96 % des décès au niveau mondial) avec 233 millions de cas de paludisme estimés et 580 000 décès associés en 2022 (2). D'après le rapport 2021 de l'OMS, 177 millions de cas de paludisme et 949 000 décès ont été évités en 2020, puis 185 millions de cas et 997 000 décès en 2021. Durant les deux années constituant le pic de la pandémie (2020 et 2021), près de 63 000 décès supplémentaires dus au paludisme et 13 millions de cas peuvent être attribués aux perturbations des services de prévention, diagnostic et traitement du paludisme engendrées par la COVID. Ce dernier rapport insiste sur les menaces persistantes qui pèsent sur la lutte contre le paludisme, notamment la résistance croissante des vecteurs aux insecticides utilisés sur les moustiquaires, l'émergence de la résistance des parasites aux médicaments antipaludiques dans la région africaine, l'introduction et la propagation de l'espèce de moustique *Anopheles stephensi* vivant en milieu urbain.

D'après l'OMS, les groupes de population les plus à risque sont :

- les femmes enceintes, surtout les primipares. Dans les régions à forte transmission où l'exposition répétée aux piqûres de moustiques infectieux est courante, la plupart des gens acquièrent une immunité protectrice partielle entre 10 et 15 ans. Toutefois, dans

ces régions, les femmes enceintes restent comparativement plus sensibles au paludisme que leurs homologues non enceintes, car les réponses immunitaires cellulaires et humorales aux antigènes de *Plasmodium* sont modulées, augmentant ainsi la vulnérabilité des femmes enceintes au paludisme et à ses conséquences néfastes sur l'accouchement (anémie sévère et autres complications graves chez la mère, faible poids de naissance, avortements spontanés ou bébés mort-nés) (15). Chaque année, plus de 30 millions de grossesses à risque de paludisme ont lieu en Afrique subsaharienne. Le paludisme pendant la grossesse est donc un problème majeur de santé publique (16). Les effets néfastes du paludisme pendant la grossesse varient géographiquement en fonction de l'intensité de la transmission du paludisme ;

- les nourrissons, ayant un système immunitaire encore incompetent. Une autre conséquence du paludisme chez la femme enceinte est l'exposition du fœtus aux parasites si ces derniers traversent la barrière placentaire pendant la grossesse ou l'accouchement. Le paludisme congénital est défini comme l'existence de formes asexuées de parasites du paludisme dans le sang du cordon ombilical et/ou le sang périphérique d'un nourrisson au cours de la première semaine de vie, indépendamment de tout symptôme clinique (17). Il a été confirmé que la présence de parasites du paludisme dans le sang du cordon est due à la transmission transplacentaire d'érythrocytes infectés pendant la période anténatale (18). La prévalence du paludisme congénital varie de 0 à 54 % en Afrique subsaharienne, en raison des différentes définitions de cette forme de paludisme, de l'immunité maternelle et des types d'outils de diagnostic utilisés (19). De plus, le diagnostic du paludisme congénital est compliqué par la faible densité des parasites dans le sang périphérique des nouveau-nés ;
- les jeunes enfants (de moins de 5 ans). Environ 86 % des décès dus au paludisme dans le monde concernent des enfants de moins de 5 ans. Le paludisme est aussi responsable de 24 % de la mortalité infantile totale en Afrique subsaharienne. En effet, c'est entre six mois et cinq ans que le risque de maladie grave et de décès est le plus élevé chez les enfants : au cours de cette période, les enfants sont les plus vulnérables car ils ont perdu l'immunité maternelle et n'ont pas encore développé d'immunité spécifique à l'égard de l'infection (20) ;
- les personnes immunodéprimées et notamment celles porteuses du VIH. Les infections opportunistes sont plus fréquentes et plus graves chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli, comme les personnes séropositives. De nombreuses personnes vivant avec le VIH (PVVIH) continuent de développer des infections opportunistes,

parce qu'elles ignorent leur statut sérologique, qu'elles ne suivent pas de traitement ou que leur traitement ne maintient pas leur charge virale à un niveau suffisamment bas pour permettre à leur système immunitaire de lutter contre les infections (21). L'infection par le VIH peut aggraver le fardeau du paludisme en augmentant la vulnérabilité à l'infection ou en réduisant l'efficacité préventive et thérapeutique des médicaments antipaludiques, ces deux facteurs étant à médiation immunitaire (22). Le paludisme a été identifié récemment comme un facteur de risque d'infection concomitante par le VIH au niveau de la population. Des études ont porté sur la prévalence du paludisme asymptomatique, l'association entre le paludisme clinique et l'immunosuppression chez les patients séropositifs et les effets de l'infection palustre sur les personnes séropositives au Nigeria (23) ;

- les migrants et les voyageurs en provenance de régions non endémiques car n'ayant pas d'immunité spécifique contre *Plasmodium* ;
- les migrants venus de régions d'endémie et leurs enfants qui vivent dans des zones non endémiques et qui retournent dans leur pays d'origine car leur immunité a diminué ou a disparu. Toutefois, la question de savoir si l'immunité protectrice contre le paludisme grave est maintenue en l'absence de réexposition est débattue, certains suggérant que cette protection s'estompe rapidement et d'autres qu'elle persiste (24).

La grande majorité de la morbidité et de la mortalité dues au paludisme est causée par une infection à *P. falciparum*. La majorité des décès due au paludisme (90 %) survient chez les enfants en Afrique, où le paludisme à *P. falciparum* représente jusqu'à un décès sur six chez les enfants et est le plus important tueur d'enfants africains âgés de 1 à 5 ans. En dehors de l'Afrique, il existe une variété de paramètres de transmission où *P. falciparum*, *P. vivax*, ou les deux sont présents. Dans les milieux à faible transmission en Amérique du Sud, en Inde et en Asie du Sud-Est, les populations adultes sont également exposées au risque de paludisme grave (25). L'infection à *P. falciparum* peut conduire à diverses pathologies dont les plus fréquentes sont l'anémie sévère palustre et le neuropaludisme (ou paludisme cérébral). Elle provoque près d'un quart de décès d'enfants en Afrique subsaharienne. Les infections à *P. vivax* sont quant à elles considérées comme bénignes. Cependant, elles peuvent évoluer vers des formes graves dont le neuropaludisme (26,27).

La figure 1 montre la répartition géographique du paludisme dans le monde avec les niveaux d'endémicité. Plus de 100 pays regroupés en quatre zones sont touchés par le paludisme : une zone d'hyper endémicité située majoritairement en Afrique, une zone où la transmission est

modérée (partagée entre l’Afrique, l’Asie et l’Amérique), une zone à transmission saisonnière et enfin une zone à faible risque de transmission.

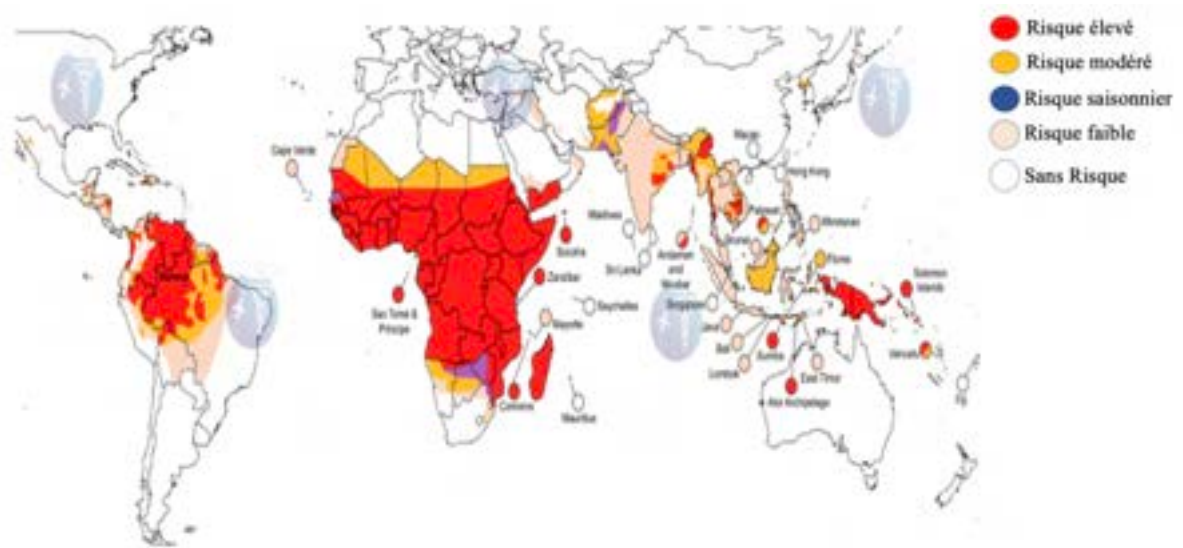


Figure 1 : Carte de la répartition du paludisme dans le monde, selon le niveau de transmission (8)

Bien que les conclusions du rapport OMS 2022 mettent en évidence le lourd fardeau du paludisme en Afrique et malgré les menaces persistantes qui pèsent sur la lutte contre le paludisme, le rapport dresse également un tableau encourageant des possibilités pour inverser les tendances et tendre vers l'élimination du paludisme à travers les investissements, la recherche et le développement, l'engagement communautaire et la volonté politique appropriés. Le rapport souligne que la recherche scientifique fournit de nouveaux outils qui pourraient aider à tendre vers l'élimination du paludisme. Il s'agit notamment de la lutte antivectorielle ciblant les moustiques vecteurs du paludisme (y compris la modification génétique des moustiques), l'amélioration des outils de diagnostic, l'introduction de nouvelles combinaisons médicamenteuses contre *Plasmodium*, la découverte des vaccins et des anticorps monoclonaux. En 2021, l'OMS a recommandé l'utilisation du vaccin RTS,S/AS01 pour prévenir le paludisme à *P. falciparum* chez les enfants vivant dans des zones de transmission modérée et élevée avec un déploiement plus large dans les pays d'endémie palustre prévu pour 2023 (3). Une association entre l'allègement de l'impact économique du paludisme à travers ces innovations scientifiques et le renforcement des capacités de fabrication sur le continent africain peuvent nous aider à nous mettre sur la bonne voie pour atteindre les ODD 2030.

2. Parasite et agent vecteur

2.1. Agent pathogène

Domaine : *Eukaryota*

Règne : *Chromalveolata*

Division : *Alveolata*

Embranchement : *Apicomplexa*

Classe : *Aconoidasida*

Ordre : *Haemosporida*

Famille : *Plasmodiidae*

Genre : *Plasmodium*

Plasmodium (parasite responsable du paludisme) se présente sous la forme d'un protozoaire (c'est-à-dire un organisme eucaryote unicellulaire), très petit (1 à 2 μm selon les formes). Il existe plus de 140 espèces de *Plasmodium* touchant diverses espèces animales (telles que les reptiles, les oiseaux et divers mammifères), dont cinq sont retrouvées en pathologie humaine. Il s'agit de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesi*. Ces espèces diffèrent par leurs critères biologiques, cliniques, par leur répartition géographique et par leur capacité à développer des résistances aux antipaludiques. Dans des conditions expérimentales, d'autres espèces peuvent exceptionnellement infecter l'homme.

Plasmodium est doté d'un complexe apical qui lui permet de pénétrer dans les cellules de l'homme (hépatocytes puis globules rouges). Ce complexe est composé de différentes structures (rhoptries, granules denses, micronèmes) qui permettent de créer une vacuole parasitophore à l'intérieur du globule rouge, qui sépare le parasite du cytoplasme (Figure 2) (28). La coloration au May-Grünwald-Giemsa permet de mettre en évidence que *Plasmodium* est constitué d'un cytoplasme bleu pâle entourant une vacuole nutritive claire, et contenant un noyau rouge et du pigment brun-doré ou noir (hémozoïne).

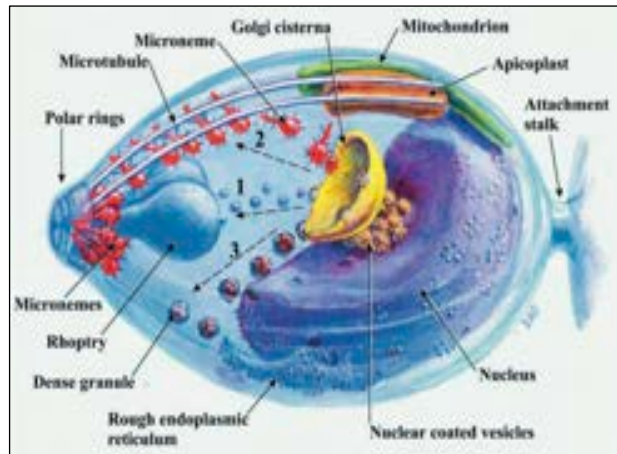


Figure 2 : Schéma anatomique de *Plasmodium falciparum* (29)

2.1.1. *Plasmodium falciparum*

Des cinq espèces plasmodiales, *P. falciparum* est l'espèce la plus largement répandue à travers le monde. Elle est endémique des zones tropicales et subtropicales, et surtout en Afrique. Cette présence dans les zones tropicales et intertropicales (majoritairement en Afrique, mais également en Asie du Sud-est, dans la zone Méditerranéenne et dans le Pacifique) s'explique par une interruption de sa transmission lorsque la température tombe en dessous de 18 °C (30). *P. falciparum* se distingue des autres espèces plasmodiales car il infecte spécifiquement l'homme et est responsable des formes cliniques graves, notamment du neuropaludisme.

Avec une durée d'incubation (phase hépatique) de 7 à 12 jours, asymptomatique chez l'homme, l'infection se traduit par une fièvre tierce maligne liée à l'invasion et l'éclatement des globules rouges suite à la multiplication des parasites. L'infection à *P. falciparum* évolue sans rechute (absence d'hypnozoïtes). On n'observe que très rarement des accès tardifs. Plus de 90 % des accès palustres à *P. falciparum* surviennent dans les 2 semaines qui suivent le retour du pays d'endémie. *P. falciparum* est également l'espèce qui développe le plus de résistance aux différents médicaments antipaludiques.

L'infection à *P. falciparum* se caractérise par un mécanisme essentiel à sa physiopathologie : la séquestration des globules rouges infectés (GRi) par *P. falciparum* dans les organes profonds. Ce mécanisme repose sur l'interaction entre un ligand du parasite appelé « *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protéine 1 » (*PfEMP1*) et les récepteurs de l'endothélium vasculaire. Cette séquestration permet au parasite d'éviter l'élimination des GRi par la rate et constitue un facteur de virulence majeur. Lorsque la séquestration se produit dans les vaisseaux sanguins du cerveau, il en résulte un neuropaludisme, une complication qui peut être fatale.

2.1.2. *Plasmodium vivax*

Très largement répandu dans les régions tropicales et subtropicales en dehors de l'Afrique (31), il est rarement observé en Afrique du Nord et est quasi absent en Afrique noire. Sa présence limitée sur le continent africain serait due à une plus faible expression de l'antigène Duffy sur les érythrocytes de la population africaine, un antigène de groupe sanguin qui, bien que non obligatoire, est couramment utilisé par *P. vivax* pour l'entrée dans les érythrocytes (32). En outre, *P. vivax* présente une forte affinité pour les réticulocytes. En raison du faible nombre de réticulocytes dans la circulation périphérique, *P. vivax* provoque un taux de parasitémie beaucoup plus faible que les autres espèces de *Plasmodium*, bien qu'il déclenche une réponse inflammatoire systémique plus importante que *P. falciparum* (33). La transmission de *P. vivax* s'arrête en dessous de 15 °C avec une durée d'incubation de 11 à 15 jours.

Dans le cas d'une infection à *P. vivax*, on peut observer des rechutes (accès de reviviscence) dues au réveil d'hypnozoïtes (stades hépatiques dormants du parasite), plusieurs mois ou années après la piqûre du moustique infectant. L'affection par *P. vivax* présente des accès de reviviscence et une fièvre rythmée dite tierce (du fait d'un cycle érythrocytaire de 48 heures). Les infections à *P. vivax* ont longtemps été considérées comme bénignes. Ainsi, si un patient atteint de *P. vivax* présente un paludisme grave, l'infection était présumée mixte. Cependant, des cas de neuropaludisme ont été rapportés chez 13 enfants avec une mono infection à *P. vivax* (31,32). D'autres études ont aussi montré l'existence de cas de paludisme grave à *P. vivax* (34). L'infection à *P. vivax* est également grave si elle touche une femme enceinte, avec le risque accru d'anémie sévère. Des résistances médicamenteuses de *P. vivax* à la chloroquine ont commencé à surgir.

2.1.3. *Plasmodium ovale*

Contrairement à *P. vivax*, *P. ovale* sévit en Afrique intertropicale du centre et de l'Ouest, en Asie du sud-est et dans certaines régions du Pacifique. Schématiquement, on dit que *P. ovale* remplace *P. vivax* en Afrique, là où cette dernière espèce n'existe pas. Il est biologiquement et morphologiquement très proche de *P. vivax*. Cependant, contrairement à *P. vivax*, il peut infecter des individus négatifs pour le groupe sanguin Duffy, ce qui explique la plus grande prévalence de *P. ovale* (plutôt que de *P. vivax*) dans la majeure partie de l'Afrique (35). Il provoque des accès de fièvre bénigne, mais peut être à l'origine d'une fièvre rythmée tierce pouvant parfois évoluer en paludisme grave (36,37). Son incubation est de 15 jours au minimum mais peut être beaucoup plus longue. L'évolution est bénigne mais on peut observer, comme avec *P. vivax*, des rechutes tardives jusqu'à 4 ans après l'infection (38,39).

2.1.4. *Plasmodium malariae*

P. malariae sévit dans le monde entier (les trois continents tropicaux) mais de manière beaucoup plus sporadique. C'est la seule espèce de parasite du paludisme humain à avoir un cycle érythrocytaire avec une périodicité de 72 heures. Son hôte habituel est l'homme mais il peut également infecter le singe. Il a une durée d'incubation plus longue (15 à 21 jours) avec une capacité à entraîner, en l'absence de traitement initial, des recrudescences très tardives pouvant aller jusqu'à 20 ans après l'infection (40). Les mécanismes physiopathologiques responsables de ces reviviscences tardives ne sont pas totalement élucidés, certains évoquent la présence de mérozoïtes latents dans les voies lymphatiques (41). Les hypnozoïtes n'ont pas été mis en évidence dans l'infection à *P. malariae* malgré l'existence de rechutes tardives. L'infection est bénigne mais *P. malariae* peut parfois entraîner des complications rénales.

2.1.5. *Plasmodium knowlesi*

Outre les quatre espèces de *Plasmodium* transmises à l'homme, une infection zoonotique par *P. knowlesi* a été reconnue en 2004 à la suite d'une épidémie dans une communauté humaine de Malaisie occidentale (42). Depuis, des infections humaines par *P. knowlesi* ont été signalées dans d'autres pays d'Asie du Sud-Est tels que l'Indonésie, le Myanmar, le Laos, Singapour, la Thaïlande, les Philippines, le Cambodge et le Viêt Nam (43). *P. knowlesi* sévit dans toute l'Asie du Sud-Est (particulièrement en Malaisie, à Bornéo) en zone forestière car il est étroitement lié à la répartition des singes macaques (son hôte habituel) et de son vecteur piquant l'homme et le singe. Il est morphologiquement proche de *P. malariae*. Il a été suggéré que l'augmentation de la déforestation entraîne un contact étroit entre les moustiques vecteurs, les singes hôtes primaires et les humains hôtes potentiels (44). Ainsi, *P. knowlesi* est désormais considéré par l'OMS comme l'un des agents responsables du paludisme humain (45).

Contrairement aux autres espèces de *Plasmodium* infectant l'homme qui ont besoin d'au moins deux jours pour achever un cycle de réplication intra-érythrocytaire, *P. knowlesi* a un cycle de réplication de 24 heures et peut donc évoluer rapidement d'une infection sans complication à une infection grave. Les décès dus à la malaria *knowlesi* sont de plus en plus fréquents, en particulier dans l'État de Sabah, à Bornéo (Malaisie). Aucune chimiorésistance n'a été observée pour cette espèce à ce jour.

Le plus souvent simple, 10 % des infections à *P. knowlesi* conduisent à un accès grave et 1 à 2 % à une issue fatale. Une parasitémie élevée est un marqueur positivement associé à la gravité et au décès. Comme chez *P. falciparum*, la séquestration des GRi par *P. knowlesi* dans les vaisseaux sanguins a été observée lors d'un examen post-mortem. Il a été démontré que les

protéines SICA (Schizont Infected Cell Agglutination) jouent un rôle dans la cytoadhésion des GRi par *P. knowlesi* (46).

Au microscope, *P. knowlesi* ressemble à *P. falciparum* et *P. malariae*, cette méthode ne peut donc pas être utilisée pour identifier cette espèce. Un diagnostic définitif peut être établi à l'aide d'une Nested PCR (réaction en chaîne de la polymérase nichée), mais son utilisation est limitée dans les régions pauvres en ressources (10). Les tests de diagnostic rapide (TDR) peuvent être utilisés pour exclure le paludisme à *P. falciparum* dans les zones d'endémie de *P. knowlesi* (47).

2.2. Agents vecteurs

Règne : *Animalia*

Embranchement : *Arthropoda*

Classe : *Insecta*

Ordre : *Diptera*

Sous-ordre : *Nematocera*

Famille : *Culicidae*

Sous-famille : *Anophelinae*

Genre : *Anopheles*

Le paludisme est transmis à l'homme par la piqûre d'un moustique culicidé du genre *Anopheles* au moment de son repas sanguin. Parmi les 3 500 espèces de moustiques existantes et décrites dans la littérature, 464 espèces d'*Anophèles* sont actuellement identifiées mais toutes ne sont pas capables de transmettre le paludisme. Seule la femelle, hématophage, est capable de transmettre le paludisme à l'être humain (48). On retrouve principalement *Anopheles gambiae* en Afrique, *Anopheles darlingi* en Amérique du Sud et *Anopheles stephensi* en Asie (Figure 3). L'*Anophèle* femelle pique le soir à partir du coucher du soleil et la nuit avec un maximum d'activité entre 23 heures et 6 heures expliquant ainsi que les Moustiquaires Imprégnées d'Insecticide (MII) constitue le moyen de prévention individuelle le plus efficace. De plus, l'infection du moustique serait favorisée par l'attraction de ce dernier par les humains porteurs du parasite au stade gamétocytaire, le stade infectieux pour le moustique (49). Les espèces anthropophiles qui ont une préférence à piquer l'homme plutôt que l'animal, et les espèces endophiles qui se reposent à l'intérieur des maisons, constituent les espèces les plus dangereuses. Des facteurs climatiques, environnementaux et humains comme la sécheresse, les variations de température, l'assèchement de marécages, la construction de barrages, les méthodes d'irrigation, ou la construction de routes, peuvent contribuer à modifier la répartition

des *Anophèles* dans une région donnée, influençant ainsi le niveau de transmission du paludisme (50).

Les *Anophèles*, comme tous les moustiques, ont un cycle de vie en quatre stades : le stade zygotique, le stade larvaire, le stade pupaire et enfin, le stade imaginal (adulte). D'une durée de 7 jours à 5 semaines selon l'espèce et la température ambiante, les trois premiers stades se déroulent en milieu aquatique. Le stade adulte se déroule en milieu aérien où le développement et la longévité des *Anophèles* dépendent de la température avec un optimum entre 20 et 30°C pour une durée de vie moyenne de 3 à 4 semaines pour les principaux vecteurs de *Plasmodium* en Afrique sud-saharienne (51).



Figure 3 : *Anophèle* femelle (vecteur du paludisme)

(A) : *Anopheles gambiae* (52); (B) : *Anopheles darlingi* (53); (C) : *Anopheles stephensi* (54)

3. Cycle de développement de *P. falciparum*

Toutes les espèces de *Plasmodium* qui infectent l'homme partagent un cycle de développement en deux parties :

- 1/ une étape de multiplication asexuée qui se déroule chez l'Homme (hôte intermédiaire) pendant laquelle le parasite effectue deux cycles asexués (ou schizogoniques). Le premier cycle asexué a lieu dans le foie, on parle de phase hépatique ou pré-érythrocytaire (= exo-érythrocytaire). Cette phase correspond à la phase d'incubation, cliniquement asymptomatique. Le second cycle asexué se déroule dans la circulation sanguine, c'est la phase érythrocytaire qui correspond à la phase clinique de la maladie ;
- 2/ une étape de multiplication sexuée qui se déroule chez le vecteur, le moustique *Anophèle* (hôte définitif) où le parasite effectue son cycle sexué (ou sporogonique).

3.1. Cycle asexué chez l'homme

Le cycle de développement de *P. falciparum* commence lorsqu'un moustique vecteur *Anophèle* injecte au cours du repas sanguin des sporozoïtes dans le système circulatoire d'un hôte humain (Figure 4). Le moustique parasité injecte à l'homme quelques dizaines de sporozoïtes (ou formes infestantes) qui migrent rapidement jusqu'au foie avec le flux sanguin. Les sporozoïtes se déplacent ensuite vers les cellules hépatiques et les envahissent pour initier le cycle de développement exoérythrocytaire. Durant cette période de migration, les parasites peuvent être éliminés par le système immunitaire de l'hôte via la phagocytose. Moins vulnérables une fois à l'intérieur des hépatocytes de l'homme, les sporozoïtes peuvent assurer leur multiplication et leur maturation qui aboutit à la formation de schizontes hépatiques. Ce cycle hépatique est totalement asymptomatique. Il n'a lieu qu'une fois et dure 1 à 3 semaines selon l'espèce. Une fois matures, ces schizontes hépatiques libèrent des mérozoïtes dans la circulation périphérique pour envahir les érythrocytes initiant ainsi le cycle de développement intraérythrocytaire. D'une durée de 48 heures, le cycle de développement intra-érythrocytaire implique une prolifération asexuée à travers les stades d'anneau, de trophozoïte et de schizonte. Les schizontes se rompent ensuite et libèrent de nouveaux mérozoïtes filles qui répètent le cycle. Sans traitement, cette multiplication se répète jusqu'à l'apparition de symptômes sévères jusqu'au décès, ou évolue en paludisme asymptomatique si la personne infectée est immune. Au cours de chaque cycle de développement intra-érythrocytaire, une petite proportion ($\leq 10\%$) des parasites s'écarte de ce cycle et s'engage dans la gamétocytogenèse (la différenciation sexuelle). Les mérozoïtes sexuellement engagés envahissent les érythrocytes, formant des gamétocytes de stade I puis gagnent la moelle osseuse où se produit la maturation ultérieure en gamétocytes de stades II à IV (55,56). Ce processus de gamétocytogenèse produit des gamétocytes mâles et femelles matures de stade V qui pénètrent à nouveau dans le système circulatoire de l'hôte pour être transmis aux moustiques anophèles femelles pendant le repas sanguin. Les gamétocytes de stade V étant les seules formes transmissibles du parasite du paludisme, ils sont devenus le point de mire de la découverte et du développement de composés bloquant la transmission afin de contribuer aux stratégies d'élimination du paludisme (57).

3.2. Cycle sexué chez le moustique

Lors de l'absorption de sang, un moustique *Anophèles* ingère les gamètes mâles (microgamétocytes) et femelles (macrogamétocytes). Dans l'estomac du moustique, la fusion entre les microgamètes et les macrogamètes produit des zygotes diploïdes mobiles et allongés qui se transforment en un ookinète mobiles tétraploïdes. Les ookinètes envahissent la paroi intestinale du moustique, où ils se développent en oocystes. Les oocystes grandissent, se

rompent en libérant des sporozoïtes qui vont gagner les glandes salivaires du moustique. L'inoculation des sporozoïtes dans un nouvel hôte humain perpétue le cycle évolutif du paludisme. Le cycle sexué chez le moustique dure entre 9 et 16 jours selon l'espèce de *Plasmodium* (9 à 10 jours pour *P. falciparum*, 6 à 13 jours pour *P. vivax*, 12 à 14 jours pour *P. ovale*, 14 à 16 jours pour *P. malariae* et 9 à 10 jours pour *P. knowlesi*).

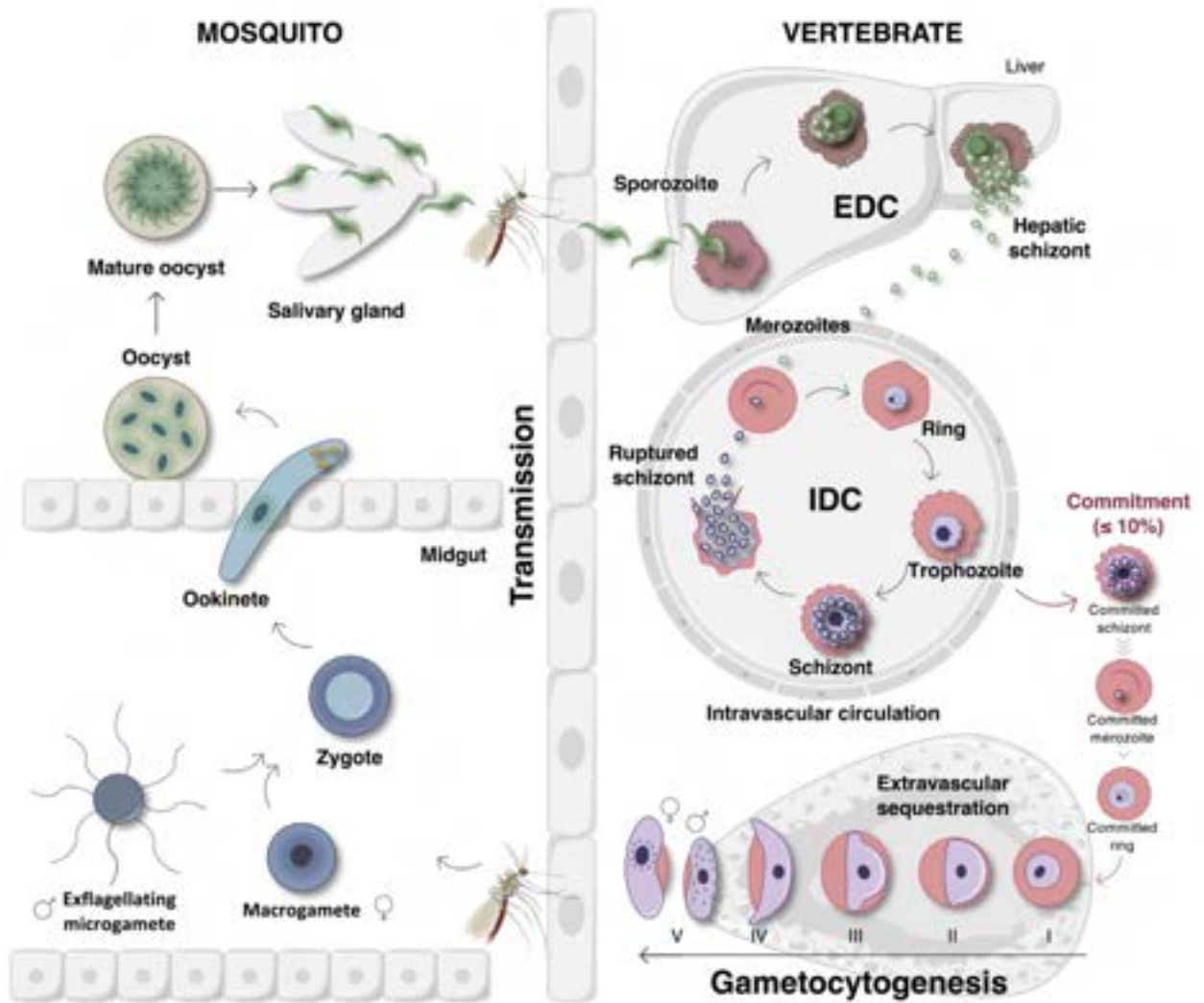


Figure 4 : Cycle de vie de *P. falciparum* chez l'homme et le moustique (58)

4. Formes cliniques de paludisme

Le diagnostic clinique d'une infection par *Plasmodium* repose essentiellement sur les symptômes physiques constatés chez le patient lors de l'examen. Les symptômes cliniques associés au paludisme sont causés par les formes asexuées du parasite (phase érythrocytaire) et varient en fonction de l'espèce plasmodiale, allant de manifestations asymptomatiques (absence de symptômes) à des accès simples (symptômes légers) voire graves (anémies

sévères, paludisme associé à la grossesse, neuropaludisme). La période d'incubation varie selon les espèces de *Plasmodium* et peut durer de 7 à 30 jours, des périodes plus courtes étant observées chez *P. falciparum* et des périodes plus longues chez *P. malariae*. Environ 95 % des individus développent des symptômes dans les 6 semaines suivant l'exposition (31). En général, le paludisme est une maladie curable si elle est diagnostiquée et traitée rapidement et correctement.

Au cours de la phase érythrocytaire, de nombreux déchets tels que le pigment hémozoïne et d'autres facteurs toxiques s'accumulent dans le GRi et sont ensuite déversés dans la circulation sanguine lors de la rupture (lyse) des GRi pour libérer les mérozoïtes invasifs. Une fois libérée dans la circulation sanguine, l'hémozoïne couplée à d'autres facteurs toxiques, tels que le GPI (glucosylphosphatidylinositol), stimule les monocytes et d'autres cellules qui produisent des cytokines inflammatoires notamment le TNF, les facteurs du complément, les prostaglandines et d'autres facteurs pyrogènes qui agissent en déclenchant une réponse fébrile (59,60).

Les signes cliniques se manifestent en général chez des individus dont l'immunité n'est pas encore développée (les jeunes enfants et les voyageurs en zone d'endémie), ou lorsque l'immunité établie fait défaut (grossesse et PVVIH). En zone de forte endémie, l'infection peut se manifester de manière "asymptomatique", c'est-à-dire sans aucun symptôme chez l'adolescent et l'adulte. Certains experts proposent de préférer le terme de paludisme "chronique" à celui de paludisme "asymptomatique" en raison des conséquences négatives à long terme des cas non traités (61).

Outre la fièvre intermittente souvent associée à une anémie, d'autres signes cliniques, à savoir une asthénie, une anorexie, des perturbations rénales, et une hépato-splénomégalie due à une forte activité phagocytaire sont aussi observés. Le diagnostic du paludisme repose sur la mise en évidence de *Plasmodium* dans le sang, généralement par microscopie. D'autres résultats de laboratoire peuvent inclure une légère diminution des plaquettes sanguines (thrombopénie), une hémolyse, une élévation de la bilirubine et une élévation des aminotransférases. En absence de traitement, l'hyperthermie se prolonge, la parasitémie s'accroît et les symptômes associés sont plus accentués.

4.1.L'accès simple

C'est la forme clinique la plus fréquente du paludisme. Elle se définit par un diagnostic biologique positif et l'expression de manifestations cliniques palustres sans complications. La caractéristique principale de la maladie, « la fièvre », coïncide avec la libération cyclique de parasites lors de la rupture des érythrocytes par les schizontes. On observe néanmoins divers degrés dans l'intensité et l'évolution du syndrome selon l'espèce parasitaire. L'évolution

clinique classique comprend des épisodes fébriles alternant avec des périodes sans symptômes. Chez le sujet non-immun, l'accès fébrile typique du paludisme s'accompagne d'une succession de 3 états : frissons, impression de chaleur, sueur. Le premier stade se caractérise par une sensation de froid, frissons. Il est suivi par la phase chaude qui comprend de la fièvre, atteignant parfois 40-41 °C, accompagnée de maux de tête, de nausées, de vomissements, de céphalées, de myalgies et éventuellement de convulsions, en particulier chez les jeunes enfants. Cette phase s'achève par la phase de transpiration au cours de laquelle la fièvre s'estompe (59). Bien que rarement observée, la durée des épisodes fébriles a été historiquement associée à différentes espèces. Ainsi, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* provoquent un accès fébrile toutes les 48 heures (fièvre "tertième"), et *P. malariae* - toutes les 72 heures (fièvre "quartane") (31). *P. knowlesi* présente quant à lui une fièvre quotidienne (cycle de 24h).

Dans la grande majorité des cas, l'accès palustre à *P. falciparum* se présente par un tableau infectieux non spécifique d'aspect pseudogrippal qui se traduit par de la fièvre, des frissons et des douleurs abdominales. L'infection par *P. falciparum* peut cependant conduire à un accès palustre grave chez des sujets avec des facteurs de risque associés (âge extrême, malnutrition, immuno-dépression) ou considérées comme non immuns vis-à-vis du parasite (enfants < 5 ans, femme enceinte et voyageurs).

4.2. Paludisme grave

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le paludisme grave est défini par la présence d'une ou plusieurs des complications suivantes survenant en l'absence d'une autre cause attribuable (62) :

- anémie sévère due à l'hémolyse (destruction des globules rouges) : $Hb \leq 5$ g/dl ou un Hte $\leq 15\%$ chez l'enfant de moins de 12 ans et une $Hb \leq 7$ g/dl ou un Hte $\leq 20\%$ chez l'adulte ;
- hémoglobinurie (présence d'hémoglobine dans les urines) due à l'hémolyse ;
- Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA), une réaction inflammatoire des poumons qui inhibe l'échange d'oxygène et qui peut survenir même après que le nombre de parasites ait diminué en réponse au traitement ;
- anomalies de la coagulation sanguine ;
- hypotension artérielle causée par un collapsus cardiovasculaire ;
- lésions rénales aiguës : créatinine plasmatique ou sérique > 265 $\mu\text{mol/l}$ ou urée sanguine > 20 mmol/L ;
- hyperparasitémie, lorsque plus de 10 % des globules rouges sont infectés par *Plasmodium* ;

- acidose métabolique (acidité excessive du sang et des liquides tissulaires), souvent associée à une hypoglycémie ;
- troubles de la conscience : score de Glasgow < 11 (chez l'adulte) et un score de Blantyre (SB) < 3 (chez l'enfant) ;
- convulsions répétées (> 2 épisodes en 24h) ;
- hypoglycémie (glucose sanguin ou plasmatique < 2,2 mmol/L) ;
- insuffisance rénale ;
- hyperbilirubinémie : bilirubine plasmatique ou sérique > 50 µmol/L ;
- œdème pulmonaire ;
- anomalies hémorragiques ;

Les facteurs de risque de paludisme grave comprennent la résidence dans des zones non endémiques, le jeune âge, la grossesse et l'immunodépression (63). Les enfants sont plus susceptibles de développer des convulsions, une hépatosplénomégalie et une anémie sévère, tandis que les adultes présentent un risque plus élevé d'insuffisance rénale aiguë et d'œdème pulmonaire (64). *P. falciparum* est responsable de la majorité des cas graves en raison de l'expansion rapide de la biomasse parasitaire, de la séquestration des GRi, de l'obstruction microvasculaire, de l'activation endothéliale et des lésions des organes terminaux qui en résultent. *P. knowlesi* peut provoquer une maladie grave par des mécanismes similaires (65). La pathogenèse du paludisme grave causé par *P. vivax* est mal comprise car ce parasite n'a pas tendance à produire de séquestration (31). Le paludisme grave est une urgence médicale et doit être traité d'urgence.

4.2.1. Le neuropaludisme

Le neuropaludisme causé par *P. falciparum* est une complication neurologique mortelle du paludisme et les enfants de moins de 5 ans sont les plus vulnérables (45). Il se caractérise par un coma non imputable à d'autres neuropathologies, associé à une parasitémie de type *P. falciparum*. De toutes les complications graves du paludisme, le neuropaludisme est la plus mortelle, avec un taux de mortalité de 100 % en l'absence de traitement et un taux de létalité de 15 à 25 % en cas de traitement avec la thérapie antipaludique de première intention actuelle (artésunate) (66). Les enfants atteints de neuropaludisme présentent un coma aigu souvent précipité par des convulsions et des antécédents de fièvre, de vomissements et d'anorexie depuis un à trois jours. Dans les deux jours qui suivent le développement des symptômes, la plupart des enfants se rétablissent ou succombent à la maladie (67). En outre, 14 à 25 % des survivants souffrent de séquelles neurologiques à long terme, telles que l'hémiplégie, des

troubles de la parole et d'épilepsie, avec parfois des déficits neurologiques à vie (68). Au Bénin, notre étude (NeuroCM) a rapporté 30 % de décès chez les enfants âgés de 2 à 6 ans (69).

Comme il n'existe pas de thérapie spécifique en dehors de la prise en charge symptomatique, toutes les stratégies visent à éliminer le parasite du système tout en ciblant les symptômes résultant de complications graves telles que la détresse respiratoire ou les convulsions. En outre, il est impossible de prédire quels enfants sont susceptibles de développer des complications cérébrales, car les mécanismes moléculaires exacts de la pathologie humaine ne sont pas encore totalement élucidés. Les études animales, qui constituent un moyen raisonnable d'étudier la physiopathologie moléculaire, ont montré que le neuropaludisme est, au moins en partie, une maladie à médiation immunitaire. Il a récemment été prouvé que les complications cérébrales sont causées par une réponse immunitaire erronée de l'hôte provoquée par l'infection parasitaire (66,70–72). C'est pourquoi, les thérapies axées sur la régulation des cellules immunitaires constituent des stratégies thérapeutiques d'intérêt.

La physiopathologie du neuropaludisme, ses manifestations cliniques et approches thérapeutiques ainsi que le rôle des cellules immunitaires (monocytes et cellules endothéliales) dans la neuroinflammation seront abordés dans la partie II de ce document.

4.2.2. Paludisme associé à la grossesse

Dans les régions où la transmission de *P. falciparum* est endémique, l'immunité contre le paludisme est acquise au cours de l'enfance et les adultes sont généralement protégés. Néanmoins, les femmes enceintes, notamment au cours de leur première grossesse, sont susceptibles de contracter le paludisme placentaire et d'en subir les conséquences cliniques graves (73). Le paludisme placentaire se caractérise par une accumulation massive de GRi par *P. falciparum* et de monocytes dans les espaces intervilloux du placenta, ce qui entraîne une anémie maternelle, de l'hypertension chez la mère, une altération des échanges materno-fœtaux qui peut conduire au décès du nourrisson ou à une insuffisance pondérale à la naissance, ainsi qu'à un retard de croissance du fœtus (74). Le paludisme placentaire constitue un problème majeur de santé publique en raison de ses effets néfastes sur la santé de la mère et du fœtus. En effet, le paludisme pendant la grossesse peut être à l'origine de plus de 200 000 décès de nourrissons en Afrique subsaharienne chaque année et de l'accouchement de plus de 800 000 bébés de faible poids à la naissance (75). La prévalence du paludisme placentaire diminue fortement au fil des grossesses (76). Les parasites qui sont séquestrés dans le placenta expriment préférentiellement la protéine VAR2CSA, un membre de la famille PfEMP1 des protéines parasitaires adhésives, qui se lie sélectivement à la chondroïtine sulfate A (CSA) du placenta (75). VAR2CSA est aujourd'hui le principal candidat pour un vaccin contre le

paludisme placentaire. Des études ont récemment démontré l'innocuité et l'immunogénicité de deux vaccins contre le paludisme placentaire dérivés de VAR2CSA (PRIMVAC et PAMVAC), chez des femmes non enceintes naïves du paludisme et exposées à *P. falciparum* dans deux essais cliniques de phase I distincts (ClinicalTrials.gov, NCT02658253 et NCT02647489) (77).

4.2.3. Autres formes de paludisme grave

- Les anémies graves dues aux infections récurrentes à *P. falciparum* se produisant en particulier chez les jeunes enfants d'Afrique tropicale qui souffrent d'infections fréquentes insuffisamment traitées.
- Une rupture de la rate provoquée en de rares occasions par le paludisme à *P. vivax*.
- Le syndrome néphrotique (une maladie rénale chronique grave) qui peut résulter d'infections chroniques ou répétées par *P. malariae*.
- La splénomégalie palustre hyperréactive (également appelée "syndrome de la splénomégalie tropicale"), peu fréquente, attribuée à une réponse immunitaire anormale à des infections palustres répétées. La maladie se caractérise par une hypertrophie de la rate et du foie, des résultats immunologiques anormaux, une anémie et une susceptibilité à d'autres infections (telles que les infections cutanées ou respiratoires).

II. Le neuropaludisme

1. Physiopathologie du neuropaludisme

La pathophysiologie du neuropaludisme est un processus multifactoriel lié à l'adhésion et à la séquestration des GRi dans les microvaisseaux cérébraux, aux réponses immunologiques, à l'activation des cellules endothéliales et à la perte de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (78). Néanmoins, chacun de ces mécanismes n'explique pas à lui seul la pathogenèse du neuropaludisme, et ils participent conjointement à cette infection mortelle.

1.1. Les parasites et le phénomène de séquestration

Le cycle de développement intra-érythrocytaire de *P. falciparum* implique une prolifération asexuée à travers les formes jeunes (les stades "ring") qui se multiplient et évoluent en formes matures (trophozoïtes et de schizontes). Pour sa survie et aussi échapper au système immunitaire de l'hôte, le parasite utilise les mécanismes d'adhérence qui lui permettent de rentrer dans les érythrocytes (invasion des érythrocytes par les mérozoïtes), puis de retirer les GRi du flux circulatoire pour éviter la destruction dans la rate (séquestration des GRi) (79). Le premier mécanisme se déroule au début du cycle de développement érythrocytaire du parasite via le phénomène de reconnaissance et d'invasion des érythrocytes par le mérozoïte, le second

lors de la maturation des parasites via le phénomène de séquestration parasitaire. Chez *P. falciparum*, ce processus de séquestration est si efficace que seuls les érythrocytes infectés par les formes jeunes de parasites (les stades "ring") sont présents dans la circulation périphérique des personnes infectées. Ainsi, tous les érythrocytes infectés par *P. falciparum* âgés de plus de 18 heures environ sont séquestrés dans les veinules postcapillaires de divers tissus et organes pendant le reste du cycle de multiplication asexuée du parasite. À la fin des années 1980, il était déjà connu que la séquestration tissulaire spécifique des GRi par *P. falciparum* implique une molécule parasitaire de poids moléculaire élevé (>200 kD), spécifique de la souche infectante et exprimée au niveau des knobs (protubérances à la surface de l'érythrocyte). Cette molécule a été baptisée *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (*PfEMP1*) (80–82). Une quinzaine d'années plus tard, trois études indépendantes utilisant des approches expérimentales différentes et publiées l'une après l'autre ont démontré que *PfEMP1* était en fait une famille de protéines codées par la famille des gènes *var* (83–85).

Les GRi adhèrent aux récepteurs endothéliaux de l'hôte dans les veinules postcapillaires de certains organes, tels que les poumons, le foie, l'intestin, le cerveau et le placenta (86). La séquestration, rendue possible par l'apparition de knobs, peut avoir des conséquences désastreuses lorsqu'elle se produit dans des organes tels que le cerveau ou le placenta (87). Les knobs apparaissent à la surface des GRi environ 16 heures après l'invasion, atteignent une densité maximale environ 20 heures plus tard, suivie d'une légère diminution de la densité vers la fin du cycle intra-érythrocytaire de 48 heures (88). Ces knobs sont formés par des interactions entre les protéines de l'hôte et du parasite dans un réseau complexe impliquant des protéines membranaires du GR, telles que la spectrine et l'actine, et les molécules dérivées du parasite, à savoir ring-infected erythrocyte surface antigen (RESA), knob associated histine-rich protein (KAHRP), mature parasite-infected erythrocyte surface antigen (MESA) et *PfEMP3* (79). Les KAHRP forment la base du complexe du knobs. En moyenne, trois molécules de *PfEMP1* sont situées à l'extrémité de chaque knobs (Figure 5). La liaison de KAHRP à la spectrine est nécessaire à la formation de la structure en spirale, mais KAHRP elle-même ne semble pas être un composant de la spirale. La protéine PHIST peut être reliée à *PfEMP1* et au cytosquelette.

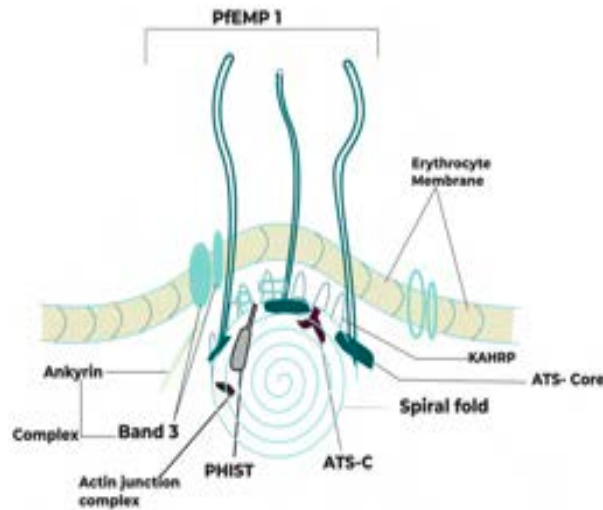


Figure 5 : Présentation de *PfEMP1* sur des knobs à la surface du GRI (89).

Le phénomène de séquestration néfaste pour l'hôte et à l'origine de la pathologie semble indispensable et bénéfique à la survie de *P. falciparum*. La virulence de *P. falciparum* est liée à sa capacité à échapper à l'immunité de l'hôte grâce à la variation antigénique des protéines exprimées à la surface du GRI, protéines appelés « variant surface antigen » (VSA) et au phénomène de séquestration. Les grandes familles de VSA sont les protéines *PfEMP1* codées par la famille des gènes *var* (60 gènes par génome haploïde), RIFIN, codées par les gènes *rif* (repetitive interspersed family, 150 gènes), et les protéines STEVOR (35 gènes), SURFIN (11 gènes) et PfMC-2TM (*Plasmodium falciparum* « Maurer's Cleft 2 transmembrane domains protein », 13 gènes). La séquestration des GRI dans les organes profonds dépend de l'affinité entre le VSA et les récepteurs endothéliaux de l'hôte. La protéine *PfEMP1* joue un rôle central dans l'échappement du parasite à l'immunité via la cytoadhérence des GRI à l'endothélium vasculaire au travers de la grande variété des gènes *var* qui codent pour cette protéine (90). Il résulte de cette cytoadhérence une obstruction vasculaire à l'origine des symptômes observés lors de l'infection et une réponse immunitaire localisée.

Dans le cas du paludisme associé à la grossesse, l'infection est plus fréquente chez les femmes primipares (première grossesse) ou les paucipares (deuxième ou troisième grossesse) que chez les femmes multipares (plus de trois grossesses) (91). Pendant la grossesse, les GRI expriment la protéine *PfEMP1* VAR2CSA qui possède un domaine actif Duffy binding-like γ , qui permet l'adhésion et la séquestration des GRI dans les espaces intervilloux du placenta, via une interaction entre *PfEMP1* et le récepteur placentaire chondroïte sulfate A (CSA) (92). Les observations anatomo-pathologiques de placentas parasités montrent d'importantes lésions inflammatoires avec des dépôts de fibrinoïde similaires à une intervillite chronique. Le

développement d'anticorps contre le VAR2CSA est un médiateur important de la réduction du risque de paludisme associé à la grossesse. Cependant, dans les régions où les taux de transmission sont faibles, toutes les grossesses présentent un risque accru de paludisme placentaire en raison de la faible immunité de la population (93). Quant au neuropaludisme, il est associé à une séquestration importante des GRi dans les microvaisseaux cérébraux. Des études sur les patients décédés de paludisme grave ont montré que le décès lié à un neuropaludisme était directement associé à la séquestration massive des GRi dans les microvaisseaux cérébraux avec une corrélation entre le nombre de GRi séquestrés et la congestion microvasculaire (94,95). Une étude post-mortem portant sur 21 enfants ghanéens (10 cas de neuropaludismes, 5 anémies sévères palustres, 1 méningite bactérienne purulente, 2 infections du système nerveux non central et 3 enfants non infectés au moment de leur décès) montre la présence de gros noyaux vésiculaires, la destruction endothéliale, l'activation du facteur de transcription NF- κ B, l'expression accrue de molécules d'adhésion cellulaire, telles que « Intercellular Adhesion Molecule 1 » (ICAM-1, CD54), « vascular cell adhesion molecule-1 » (VCAM-1, CD106), la sélectine E et la dégradation de la BHE chez les enfants présentant un neuropaludisme ou une anémie sévère palustre (96).

Outre le phénomène de cytoadhérence, deux autres manifestations d'adhérence des hématies infectées ont été rapportées comme associées à la sévérité de l'infection palustre : le clumping qui est l'agglutination des GRi avec des plaquettes et le rosetting qui est l'agglutination des GRi avec des hématies saines.

1.1.1. Rôle de *PfEMP1* et gènes *var* dans la cytoadhérence des globules rouges infectés

Antigène variant de surface le plus étudié, la protéine *PfEMP1* constitue une cible vaccinale à fort potentiel. *PfEMP1* est exprimée sur la surface membranaire des GRi via un domaine transmembranaire ancré dans la membrane érythrocytaire, suivi d'un segment conservé C-terminal intracellulaire de nature acide (ATS) qui est lié à la protéine KAHRP, protéine des knobs (Figure 5). *PfEMP1* favorise l'adhésion des GRi aux cellules endothéliales du cerveau (97–99). Plusieurs études ont associé la famille des *PfEMP1* à la pathogenèse du paludisme. L'affinité de cette protéine pour différents récepteurs de l'hôte semblent importantes sur le devenir de l'infection et surtout sur sa sévérité.

1.1.1.1. Structure de *PfEMP1*

Les protéines *PfEMP1* sont de poids moléculaire élevé (200-450 kD), codées par environ 60 gènes *var* à deux exons par génome haploïde de *P. falciparum* (100). La partie extracellulaire de *PfEMP1*, codée par l'exon I, est composée de cysteine-rich interdomain regions (CIDRs) et

de 2 à 10 domaines Duffy-binding-like (DBL). Ces domaines DBL et CIDR peuvent être divisés en sept (α , β , γ , δ , ε , ξ , x) et trois (α , β , γ) classes de séquences principales respectivement, chacune avec de nombreuses autres subdivisions (101). Alors que l'exon I est caractérisé par une variation de séquence intraclonale (au sein d'un même génome) et interclonale (entre génomes) importante, le court domaine transmembranaire et le segment terminal intracellulaire acide (ATS) sont codés par l'exon II, relativement conservé (101).

Les protéines *PfEMP1*, malgré la variabilité de leurs séquences, peuvent être regroupées en fonction de leur localisation chromosomique. Ainsi, nous avons les gènes *var* du groupe A (10 gènes pour la souche 3D7 de *P. falciparum*), les gènes *var* du groupe B (22 gènes) et les gènes *var* du groupe B/A (4 gènes) se trouvent tous dans les régions subtélomériques des chromosomes. Les gènes *var* du groupe C (13 gènes pour la souche 3D7 de *P. falciparum*) et les gènes *var* du groupe B/C (9 gènes) se trouvent généralement dans les régions internes des chromosomes 4, 7, 8 et 12 (102,103). Toutes les sous-familles *PfEMP1* sauf deux (Type 3 et VAR2CSA) ont une structure de tête à leur extrémité N-terminale qui est composée d'un domaine DBL α semi-conservé et d'un domaine CIDR (104). Cette structure est suivie d'une deuxième paire DBL-CIDR plus diversifiée dans la plupart des protéines *PfEMP1* appartenant aux groupes B, B/C et C. Les protéines *PfEMP1* des groupes A et B/A sont composées d'un total de 7 à 10 domaines extracellulaires, y compris des domaines DBL supplémentaires en amont et/ou en aval de la deuxième paire DBL-CIDR (105).

Comme le montre la figure 6, la combinaison des sous-types DBL et CIDR dans différentes protéines *PfEMP1* n'est pas aléatoire et a conduit à l'identification de 21 domaines appelés domaines cassettes (DCs). Les DCs sont définies comme des séquences de gènes *var* codant deux ou plusieurs domaines DBL ou CIDR avec des sous-classes qui peuvent prédire leur spécificité au récepteur de la protéine *PfEMP1*. Nous avons comme exemple :

- DC4 (DBL α 1.1/1.4-CIDR α .6 -DBL β 3), une sous-famille de *PfEMP1* du groupe A qui se lie au récepteur ICAM-1 (CD54) mais pas à CD36 (106), deux récepteurs de l'endothélium vasculaire ;
- DC5 (DBLg12-DBLd5-CIDRb3/4-DBLb7/9), une sous-famille de *PfEMP1* du groupe A qui se lie à PECAM-1 (CD31) exprimé par les cellules endothéliales, les monocytes, les plaquettes et les granulocytes (107) ;
- DC8 (DBL α 2-CIDR α 1.1/8-DBL β 12-DBL γ 4/6), une sous-famille de *PfEMP1* du groupe B qui semble avoir évolué par recombinaison des gènes ancestraux des gènes *var* du groupe A et du groupe B ;

- DC13 (DBL α 1.7 et CIDR α 1.4). DC8 et DC13 se lient à EPCR (108).

Les gènes du groupe var A et la liaison de *PfEMP1* aux récepteurs ICAM-1 et EPCR sont associés au paludisme sévère et plus particulièrement au neuropaludisme.



Figure 6 : Gènes *var* et structure de *PfEMP1*(109)

1.1.1.2. Rôle de *PfEMP1*

Des caractéristiques inattendues des GRi exprimant la protéine *PfEMP1* ont été découvertes par un modèle sphéroïde 3D de la barrière hémato-encéphalique. Le génome haploïde unique de *P. falciparum* code pour près de 60 variantes de *PfEMP1*, ce qui permet à *P. falciparum* de subir des variations antigéniques et d'échapper au système immunitaire. *PfEMP1* se lie à un large éventail de récepteurs de l'hôte, notamment au cluster de différenciation 36 (CD36), ainsi qu'aux récepteurs ICAM-1, « endothelial protein C receptor » (EPCR), chondroïtine sulfatée A (CSA), « platelet endothelial cell adhesion molecule-1 » (PECAM-1, CD31), VCAM-1, thrombospondin-1 (TSP-1), E-selectin (CD62-E), fixant ainsi les GRi sur les cellules endothéliales (105,110). Les GRi exprimant *PfEMP1* interagissent avec ICAM-1 grâce à leur motif DBL β (111). De plus, la suppression *in vitro* du motif DBL β de *PfEMP1* entraîne une réduction de l'adhésion spécifique des érythrocytes à ICAM-1 sur les cellules de l'endothélium. Les patients ayant un taux élevé d'anticorps anti-*PfEMP1* ont un risque significativement réduit de développer un paludisme symptomatique (112). L'adhésion de *PfEMP1* aux récepteurs de la paroi de l'endothélium, peut activer certaines voies de signalisation et conduire à la déstructuration des complexes de jonction serrée de l'endothélium. En fin de compte, tous ces événements entraînent une altération et une rupture de la barrière hémato-encéphalique. Des études sur le mouvement des leucocytes dans l'endothélium cérébral, utilisant des modèles

murins et humains, suggèrent que l'interaction entre *PfEMP1* et ICAM-1 favorise la phosphorylation des protéines associées au cytosquelette, telles que la cortactine, la paxilline, FAK et p130Cas, ce qui entraîne un remaniement du cytosquelette endothélial, qui contribue finalement à l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (113).

1.1.2. Phénomène de rosetting

Les GRi n'adhèrent pas seulement à l'endothélium, mais aussi aux érythrocytes infectés ou non (figure 7). Le rosetting est défini comme le phénomène au cours duquel les GRi se lient aux autres GR (GRi ou non infectés) engageant les ligands du parasite et les récepteurs de la surface des GR. Certaines études associent la formation des rosettes à la virulence du parasite. Les rosettes facilitent la séquestration des GRi et la congestion microvasculaire, entraînant une obstruction du flux sanguin qui est l'un des principaux événements pathologiques dans le neuropaludisme contribuant ainsi à l'inflammation, aux lésions tissulaires et à la défaillance des organes. On pense que la formation des rosettes permet au parasite d'atteindre deux objectifs. Le premier est d'échapper au système immunitaire de l'hôte en protégeant i) les GRi de la phagocytose et des antipaludiques et ii) les mérozoïtes nouvellement libérés des anticorps inhibiteurs de l'invasion de l'hôte. Le second rôle est d'assurer la survie et la réplication du parasite en fournissant un environnement favorable aux mérozoïtes nouvellement libérés qui peuvent rapidement envahir les GR non infectés qui font partie de la rosette (le contact étroit des GRi avec des érythrocytes non infectés dans les rosettes peut favoriser l'invasion des mérozoïtes). La liaison de *PfEMP1* au CR1 sur le GR entraîne la formation de rosettes. Des études récentes ont montré qu'en plus de *PfEMP1*, *STEVOR* et *RIFIN* participent à la formation de rosettes en se liant respectivement à la glycopherine C et aux antigènes du groupe sanguin ABO (114).

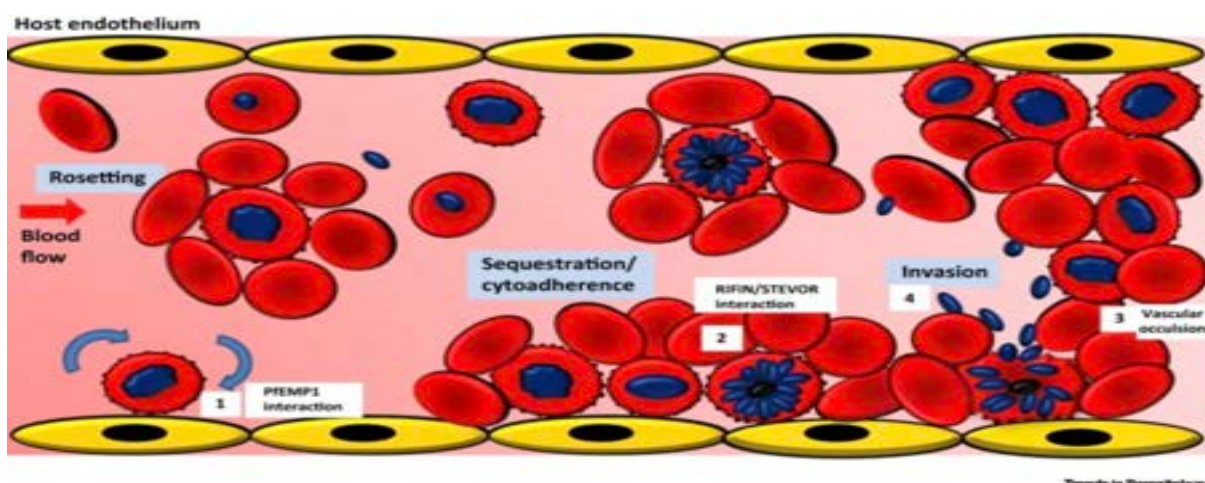


Figure 7 : Phénomènes de séquestration parasitaire et de Rosetting dans les microvaisseaux cérébraux (115)

1.1.3. Rôle des plaquettes dans la cytoadhérence des globules rouges infectés

Les plaquettes sont les cellules effectrices de l'hémostase et peuvent contribuer au développement du neuropaludisme en fournissant un mécanisme alternatif et indirect pour l'adhésion des GRi. A la suite d'une activation *in vivo*, les plaquettes génèrent une surface négativement chargée propice à la formation du complexe enzymatique (ténase et prothrombinase) et à la libération d'agents prothrombotiques dont l'adénosine diphosphate (ADP) (116). Ainsi, la thrombocytopénie observée au cours du paludisme à *P. falciparum* et du paludisme expérimental, réduit la surface disponible pour la formation de ces complexes enzymatiques cruciaux pour la coagulation au cours du paludisme. L'accumulation de plaquettes a été trouvée colocalisée avec des pigments malariques sur la surface endothéliale chez des patients malawites décédés du neuropaludisme, ce qui suggère que les plaquettes interagissent étroitement avec les GRi et les cellules endothéliales au cours de la pathologie du neuropaludisme (116). Les plaquettes sont également des cellules effectrices immunitaires, exprimant des récepteurs de chimiokines et libérant des cytokines, des chimiokines et d'autres molécules immunomodulatrices à partir des granules après activation (117). Ainsi, les plaquettes pourraient servir de pont entre l'hémostase et l'inflammation. La thrombocytopénie (la perte de plaquettes circulantes) est observée dans toutes les études sur le neuropaludisme, et l'étendue de la thrombocytopénie est en corrélation avec le développement de la maladie. Des expériences d'agglutination *in vitro* induites par les plaquettes ont révélé l'apparition d'agglutination de GRi après incubation avec du plasma riche en plaquettes. Dans le cas du neuropaludisme, un niveau élevé d'agglutination a été observé par rapport au paludisme simple. Cependant, en présence de plasma pauvre en plaquettes, aucune agglutination de GRi n'a été observée dans aucun des groupes de patients après 120 minutes de co-culture (118).

Trois récepteurs plaquettaires CD36, C1q globulaire (gC1qR/HABP1/p32) et P-sélectine ont été identifiés pour leur implication dans l'agglutination (119). Le CD36 et la P-sélectine sont connus pour être des récepteurs interagissant avec *PfEMP-1* exprimé à la surface des GRi (118). La P-sélectine augmente l'adhérence des GRi à CD36 sur l'endothélium (120) et peut agir comme un déclencheur de l'amplification du phénomène d'agglutination. L'expression de manière constitutive de CD36 (l'un des principaux récepteurs des GRi) sur les plaquettes favorise l'adhérence entre GRi et plaquettes. Suite à l'activation des cellules endothéliales par le TNF, les plaquettes peuvent se lier aux cellules endothéliales à l'aide de molécules spécifiques telles que le CD40 endothélial et le CD41 plaquettaire, formant ainsi des ponts entre les cellules endothéliales et les GRi (121). L'imagerie intravitale du cerveau de souris atteintes de paludisme cérébral expérimental (ECM) a révélé de petits amas de plaquettes

marginalisés dans les veinules post-capillaires et ces amas étaient colocalisés avec des plaques de P-sélectine (122). Ces observations sont importantes, car la déplétion des plaquettes par l'anticorps anti-CD41 à des stades précoces (non tardifs) du développement de l'ECM a protégé les souris de la maladie, ce qui révèle l'importance des plaquettes dans la pathologie de l'ECM. Les plaquettes peuvent également former des structures multimériques avec les GRi et les récepteurs endothéliaux, favorisant ainsi le recrutement des GRi dans la vascularisation cérébrale (123). L'activation des cellules endothéliales entraîne aussi une libération du facteur de von Willebrand (vWF) dans le sang, favorisant des liaisons des cellules endothéliales aux récepteurs plaquettaires tels que le complexe glycoprotéine Ia-V-VI. Cette interaction déclenche l'agrégation intravasculaire des plaquettes.

L'activation des plaquettes entraîne la libération de grandes quantités de CD40 ligand (CD40L, CD154), qui peut interagir avec le CD40 exprimé de manière constitutive sur les cellules endothéliales. L'activation des plaquettes entraîne également la sécrétion de microparticules plaquettaires (platelet microparticles, PMPs). Les PMPs sont de petites vésicules de la membrane plasmique dont la taille varie de 0,1 à 1 micromètre et qui expriment une gamme variée de récepteurs à leur surface. Ceux-ci comprennent la P-sélectine, les complexes glycoprotéiques tels que IIb/IIIa et Ib/IX, le facteur tissulaire (TF) et la phosphatidylsérine. Ces récepteurs favorisent l'adhésion des plaquettes à l'endothélium et la coagulation. L'activation plaquettaire entraîne également la translocation des granules alpha à la surface des plaquettes. Les granules alpha sont des organites sécrétoires présents à l'intérieur des plaquettes et contiennent des récepteurs tels que la P-sélectine. L'activation plaquettaire entraîne l'expression de ces récepteurs à la surface des plaquettes, ce qui favorise l'activation endothéliale et la séquestration des GRi (123).

En outre, l'activation des plaquettes entraîne une libération massive du facteur de croissance TGF- β 1 à partir de leurs α -granules (124). Des études récentes ont révélé qu'après une accumulation amplifiée et une libération dans les microvaisseaux cérébraux, le TGF- β 1 pourrait agir conjointement avec le TNF pour induire l'apoptose endothéliale (125). En outre, les plaquettes sont un facteur important dans la résolution des réactions inflammatoires. L'expression synchronisée de récepteurs adhésifs et immunitaires à la surface des plaquettes et la libération de certaines cytokines et médiateurs inflammatoires peuvent activer l'interaction avec les leucocytes et augmenter leur recrutement dans les microvaisseaux cérébraux (124). Avec l'aide du fibrinogène et d'ICAM-2, le médiateur IL-1 β peut initier l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, ce qui contribue à l'obstruction des microvaisseaux cérébraux (126).

Outre la cytoadhérence directe (GR infectés sur la paroi endothéliale), l'agglutination et le clumping associés aux plaquettes contribuent également à l'obstruction des microvaisseaux cérébraux chez les patients atteints de neuropaludisme.

1.2. Activation de l'endothélium cérébral et rôle des cellules endothéliales

1.2.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont considérées comme la structure anatomique centrale de la Barrière Hémato Encéphalique (BHE) qui tapisse les vaisseaux sanguins cérébraux et interagit avec différents types de cellules dans le système nerveux central (SNC) (127). Des différences morphologiques et fonctionnelles existent entre les cellules endothéliales de la BHE et les cellules périphériques. Du point de vue morphologique, les cellules endothéliales de la BHE sont fixées à la fois par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes, ce qui donne des compartiments membranaires distincts (128). Elles se présentent sans fenestrations, également connues sous le nom de petits pores transcellulaires, qui limitent considérablement la libre diffusion et l'échange rapide de molécules entre le tissu cérébral et le sang (129). En outre, les quantités de mitochondries dans les cellules endothéliales de la BHE sont plus élevées que dans les cellules endothéliales périphériques, ce qui leur confère plus d'énergie. Au niveau de la fonction, les cellules endothéliales de la BHE : 1) affichent une charge de surface nette négative, repoussant tout composé chargé négativement, ainsi que des degrés assez faibles de molécules d'adhésion des leucocytes, entravant ainsi l'entrée du nombre de cellules immunitaires (130) ; 2) ont des transporteurs dédiés pour réguler l'entrée et la sortie de substrats spécifiques (131) ; 3) ont un nombre restreint de vésicules transcellulaires à travers la paroi vasculaire en raison de la résistance électrique transendothéliale élevée (132). Par ces mécanismes, les cellules endothéliales forment et maintiennent ensemble la BHE.

1.2.2. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

L'existence de la BHE a été découverte par Paul Ehrlich et prouvée par Edwin Goldmann (133,134). La BHE est vitale pour le fonctionnement normal du cerveau et constitue une barrière physiologique qui sépare le cerveau et le liquide céphalo-rachidien du reste du corps. Elle agit comme une interface cellulaire semi-perméable qui sépare le sang périphérique du parenchyme cérébral (135). Les composants de la BHE comprennent des cellules endothéliales microvasculaires formant une barrière continue grâce à des jonctions serrées, une membrane basale, des péricytes et des astrocytes qui sont en contact direct avec les neurones et la microglie (Figure 8). Cette composition est essentielle pour minimiser l'inflammation locale et les dommages neuronaux (136). La BHE, avec la microglie et les neurones, forme l'unité neurovasculaire. Outre son rôle de barrière anatomique, la BHE joue un rôle crucial dans

l'homéostasie du SNC en facilitant le transport de nutriments tels que le glucose et les acides aminés du sang vers le SNC et en éliminant les déchets métaboliques du SNC vers le sang au moyen de canaux de transports spécifiques. Les cellules endothéliales cérébrales sont structurellement et fonctionnellement différentes des cellules endothéliales d'autres organes. Elles possèdent notamment des jonctions intercellulaires serrées et des jonctions d'adhérence, qui empêchent normalement la diffusion paracellulaire passive de petites et grandes molécules et préviennent l'infiltration de cellules sanguines dans le parenchyme cérébral (137).

A ce jour, les mécanismes sous-jacents précis conduisant à l'atteinte de l'intégrité de la BHE au cours du neuropaludisme restent obscurs. Plusieurs événements non exclusifs les uns des autres ont été associés aux perturbations de la BHE dans des études humaines et murines, à savoir : (i) la séquestration des GRi dans les microvaisseaux cérébraux ; (ii) une production excessive de cytokines pro-inflammatoires ; (iii) une coagulation intravasculaire disséminée dans le cerveau ; et (iv) une dérégulation des cellules endothéliales vasculaires (133).

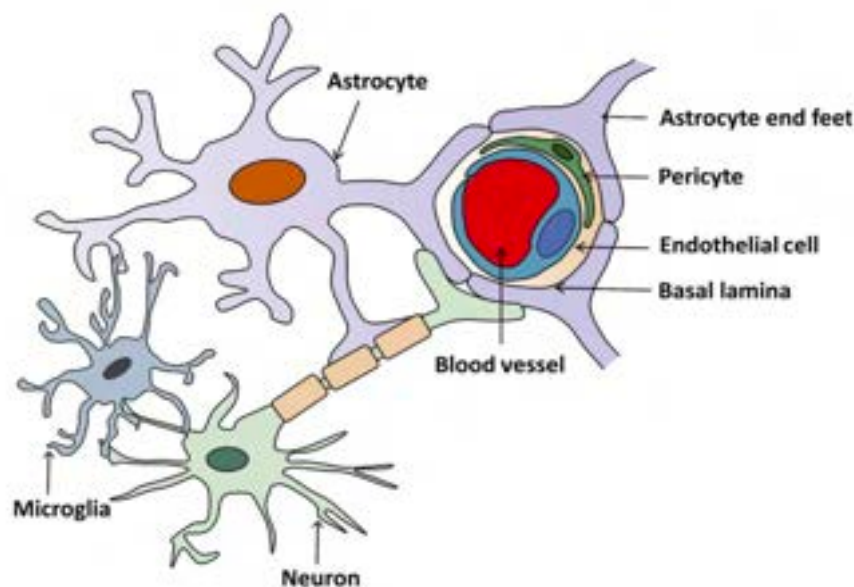


Figure 8 : Structure de la barrière hémato-encéphalique (138)

1.2.3. Activation de l'endothélium cérébral

L'activation de l'endothélium cérébral est un élément central de la pathologie du neuropaludisme. Elle est caractérisée par l'expression accrue d'une variété de molécules d'adhésion (par exemple ICAM-1, VCAM-1, P-sélectine, E-sélectine) à la surface des cellules endothéliales, l'exocytose des corps de Weibel-Palade (WPB), la rupture des jonctions serrées (139) et par plusieurs autres biomarqueurs tels que les microparticules endothéliales,

l'angiopoïétine-1 (Ang-1), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et les molécules d'adhésion cellulaire solubles (sCAMs) (140).

Avant même la séquestration des GRi, les cellules endothéliales cérébrales sont activées pendant la première phase de l'infection par *P. falciparum*. Bien que le mécanisme exact de cette activation précoce des cellules endothéliales ne soit pas connu, on suppose que la production précoce de cytokines pro-inflammatoires dans la circulation sanguine consécutive à la présence des stades asexués, de même que la présence de facteurs solubles provenant des GRi tels que la *Pf*histidine-rich-protein 2 (*Pf*HRP2) pourraient activer les cellules endothéliales cérébrales. En effet, une étude sur 113 enfants tanzaniens souffrant soit du paludisme simple, soit du neuropaludisme a révélé des taux plasmatiques élevés de *Pf*HRP2 chez les enfants souffrant de neuropaludisme. De plus, ces taux étaient corrélés avec le décès des enfants (141). La *Pf*HRP2 a été suggérée comme marqueur pronostique du neuropaludisme car les niveaux plasmatiques augmentent avec la gravité du paludisme (142). Cependant, des études menées en dehors du continent africain n'ont pas pu confirmer la corrélation entre ces taux plasmatiques et les complications de la maladie (143).

La séquestration des GRi dans les microvaisseaux cérébraux via les récepteurs ICAM-1 et EPCR contribue à l'activation de l'endothélium cérébral. Cette activation induit la phagocytose des parasites et de leurs produits par les cellules endothéliales, qui utilisent cette fonction rarement. Les astrocytes et les cellules microgliales (cellules gliales) peuvent également être activés par la phagocytose de vésicules dérivées de parasites et GRi, respectivement (16). Ces mécanismes entraînent la sécrétion par les cellules endothéliales de cytokines inflammatoires telles que le TNF et la lymphotoxine- α (LT- α) et la sécrétion par les cellules gliales de chimiokines telles que le ligand de chimiokine à motif C-X-C 10 kDa (CXCL10), également connu sous le nom de protéine 10 inductible par l'interféron- γ (IP-10). Les cellules immunitaires telles que les cellules T CD8⁺ cytotoxiques sont alors attirées vers la zone. Bien que les recherches sur le modèle murin d'ECM suggèrent que les cellules T CD8⁺ sont essentielles à la rupture de la BHE, l'apoptose des cellules endothéliales ne semble pas être une caractéristique prédominante de la rupture de la barrière (144,145).

L'angiopoïétine-1 (Ang-1) et l'angiopoïétine-2 (Ang-2) sont des régulateurs solubles essentiels de l'activation et de l'intégrité endothéliales, et les niveaux d'Ang-1 et d'Ang-2 ont été décrits comme des biomarqueurs fiables du neuropaludisme. L'Ang-2 est une glycoprotéine qui antagonise la liaison entre Ang-1 et le récepteur de la tyrosine kinase TIE-2 sur les cellules endothéliales. Alors que les interactions de l'Ang-1 avec TIE-2 maintiennent l'état de repos de l'endothélium en induisant une réponse anti-apoptotique et anti-inflammatoire, la liaison Ang-

2-TIE-2 empêche la liaison de l'Ang-1 et augmente la sensibilité endothéliale à l'inflammation, la coagulation et les facteurs induisant la perméabilité vasculaire (146). L'Ang-1 agit à l'inverse comme médiateur de l'activation des récepteurs Tie-2 sur les cellules endothéliales. Cela inhibe l'apoptose, réduit l'expression de ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine, favorise la synthèse de NO et augmente l'expression des jonctions serrées endothéliales (147). Il agit donc comme un promoteur de la quiescence et de la survie des cellules endothéliales. La libération d'Ang-2 par les corps de Weibel-Palade augmente le rapport Ang-2/Ang-1 et donc la réactivité endothéliale. Une concentration accrue d'Ang-2 avec des niveaux réduits d'Ang-1 a été associée au développement d'un paludisme grave dans plusieurs études, et les enfants atteints de neuropaludisme avec rétinopathie positive ont des niveaux plus élevés d'Ang-2, d'Ang-2/Ang-1, de Tie-2 soluble, de facteur de von Willebrand, de VEGF et de sICAM-1, et des niveaux plus faibles d'Ang-1, par rapport aux patients atteints de neuropaludisme sans rétinopathie (148–150). L'Ang-1 et l'Ang-2 sont tous deux régulés par l'oxyde nitrique (NO) produit dans l'endothélium à partir de la L-arginine. Le NO, principal protecteur de l'homéostasie de l'endothélium, provoque une vasorelaxation, une régulation à la baisse de l'expression des récepteurs endothéliaux et réduit la thrombose. La biodisponibilité du NO est réduite dans le neuropaludisme, ce qui a été associé à une issue fatale. Un faible taux de NO stimule l'exocytose du corps de Weibel-Palade et l'activation de l'endothélium, avec une augmentation de la libération d'Ang-2 par les cellules endothéliales et de l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 (151). Cependant, l'inhalation de NO en tant que traitement d'appoint du paludisme grave s'est avérée insuffisante pour modifier l'issue de la maladie (152). L'endothéline-1 (ET-1) est une autre substance vasoactive dont le taux est élevé dans le plasma des patients atteints de paludisme (153). Ce peptide est l'un des peptides vasoconstricteurs les plus efficaces du corps humain, mais la question de savoir si l'ET-1 est impliqué dans la vasculopathie dans les manifestations cérébrales du paludisme reste sans réponse.

L'analyse post-mortem de cerveaux d'adultes atteints de neuropaludisme a montré une activation généralisée des cellules endothéliales vasculaires avec l'apoptose de ces dernières, conséquence de l'adhésion des GRi. En outre, il a été démontré que les cellules endothéliales apoptotiques régulent à la hausse l'expression des molécules d'adhésion cellulaire sur les cellules endothéliales normales, ce qui entraîne une hyperadhésivité et contribue au processus pathologique et son amplification (154).

Le vWF est synthétisé par les cellules endothéliales et est libéré dans la circulation lors de l'activation endothéliale. Le vWF facilite la formation du complexe vWF/plaquette/GRi et module ainsi efficacement l'agrégation des plaquettes (155). Les GRi peuvent se lier aux

plaquettes par l'intermédiaire de la sélectine P, des récepteurs C1q et du récepteur CD36, ce qui entraîne la formation d'amas GRi/plaquettes (126). Ce phénomène a été observé chez des enfants décédés du neuropaludisme. En effet, ils présentaient une plus grande accumulation de plaquettes dans les vaisseaux cérébraux que ceux décédés d'anémie palustre sévère ou d'encéphalopathie non palustre (119). En outre, l'accumulation de plaquettes peut permettre le transfert de CD36 aux cellules endothéliales, fournissant ainsi potentiellement un récepteur supplémentaire des GRi à l'endothélium cérébral, qui n'exprime normalement que peu ou pas de CD36. Tout ceci participe à l'inflammation cérébrale avec altération de la BHE et des fuites dans le parenchyme cérébral, entraînant une rupture de la BHE.

1.3. Rupture de la barrière hémato-encéphalique

La BHE, une barrière physiologique qui sépare le cerveau et le liquide céphalo-rachidien du reste du corps, est vitale pour le fonctionnement du cerveau. La perturbation de cette barrière est une conséquence fréquente des maladies du système nerveux central. La barrière hémato-encéphalique maintient l'homéostasie en protégeant le cerveau des agents pathogènes et des produits chimiques potentiellement dangereux présents dans le sang. Elle protège également le cerveau contre les fluctuations brusques des concentrations d'ions dans le sang en maintenant un apport constant de nutriments essentiels et d'oxygène au tissu cérébral et en filtrant le dioxyde de carbone et les déchets tels que l'urée, la créatinine, pour les renvoyer dans le sang. Les petites molécules lipidiques peuvent facilement traverser les membranes lipidiques de la cellule, mais les éléments hydrophiles essentiels tels que le Na⁺, le K⁺ et le glucose ne peuvent être transportés activement que par le système de transport spécifique à médiation des cellules endothéliales (140). L'intégrité de la BHE est compromise dans diverses maladies du système nerveux central (SNC). Cette perturbation est plus prononcée dans le cas du neuropaludisme en raison de la séquestration des GRi dans les microvaisseaux cérébraux entraînant une inflammation locale (156).

L'inflammation de l'endothélium joue un rôle essentiel dans les pathologies cérébrales telles que l'ischémie cérébrale et le neuropaludisme (157). Les principaux médiateurs inflammatoires comprennent les cytokines, les molécules d'adhésion, les chimiokines, les leucocytes, les plaquettes et les cellules immunitaires telles que les lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺, les monocytes et les cellules NK (158). L'activation endothéliale par divers mécanismes peut entraîner une augmentation de la perméabilité vasculaire et une perte de l'intégrité de la BHE, comme en témoignent les hémorragies dans le cerveau des patients atteints de neuropaludisme (159). Les chimiokines MCP-1/CCL2 modifient la perméabilité de la BHE en redistribuant les protéines de la jonction serrée dans les cellules endothéliales du cerveau, ce qui entraîne un

œdème vasogène par le biais d'une hyperactivation des voies de signalisation Rho/Rho kinase au cours de la pathologie cérébrale (160). La chimiokine IL-8 (CXCL-8) est également connue pour participer à la formation d'un œdème cérébral lors de lésions d'ischémie/reperfusion.

Comme le montre la figure 9, la liaison de PfEMP1 aux récepteurs des cellules endothéliales, notamment ICAM-1, VCAM-1 et EPCR, peut déclencher de multiples voies de signalisation dans les cellules endothéliales, entraînant une modification des protéines associées au cytosquelette, ce qui aboutit finalement à la rupture de la BHE. Le remodelage du cytosquelette endothélial est induit par ICAM-1 via la phosphorylation Rho-dépendante des protéines associées au cytosquelette, notamment FAK, paxilline, p130Cas et cortactine, favorisant ainsi l'ouverture de la BHE. Parallèlement, les voies de signalisation déclenchées par PfEMP1 conduisent à l'activation et à la lésion des astrocytes, de la microglie, des neurones et des macrophages périvasculaires et déclenchent le processus de lésion neuropathologique. La liaison de PfEMP1 à l'EPCR favorise l'activation des facteurs tissulaires Va et VIIIa, perturbant ainsi la voie anticoagulante (161). L'activation de ces facteurs tissulaires entraîne la production de thrombine, ce qui conduit à un dépôt de fibrine (Figure 9). En outre, la liaison de PfEMP1 à l'EPCR active les voies Rho A et NF- κ B par le clivage de PAR1 sous l'action de la thrombine, ce qui induit une réponse pro-inflammatoire, conduisant à la rupture de la BHE. La microglie perturbe également la BHE en produisant du TNF- α et de l'IL-1 β . L'adhésion des GRi, des leucocytes et des plaquettes aux cellules endothéliales provoque également des dommages au niveau des cellules endothéliales et des changements irréversibles. L'Ang-2 produite par les cellules endothéliales entraîne également une réduction de l'enveloppe vasculaire en induisant un dysfonctionnement des péricytes. Les GRi stimulent les leucocytes (monocytes, cellules NK) à libérer des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β) en libérant des toxines parasitaires (138). Le TNF- α régule à la hausse l'expression du miR-155 dans les cellules endothéliales, ce qui entraîne un dysfonctionnement de l'intégrité de la BHE en altérant les jonctions serrées. L'IL-1 α et l'IL-1 β activent les cellules endothéliales pour qu'elles libèrent les chimiokines CCL2, CCL4, CXCL8 et CXCL10, qui favorisent l'accumulation des leucocytes y compris les cellules T CD4+, les cellules T CD8+ et les natural killer (NK). Les cellules induisent par la suite l'activation et l'apoptose des cellules neuronales par leur fonction cytotoxique (par l'intermédiaire du granzyme-B et de la perforine) (162). En raison de la perméabilité accrue de la BHE, les cytokines, les chimiokines, les cellules immunitaires et les facteurs plasmatiques pénètrent dans le parenchyme cérébral et activent les neurones et les astrocytes, entraînant des lésions nerveuses et des séquelles neurologiques (163). L'acide kynurénique produit par les macrophages et les cellules endothéliales au cours du métabolisme

du tryptophane est ensuite converti en quinoléine cytotoxique, qui joue un rôle vital dans les cellules stromales et la microglie. Toutes ces molécules induisent la rupture de la BHE.

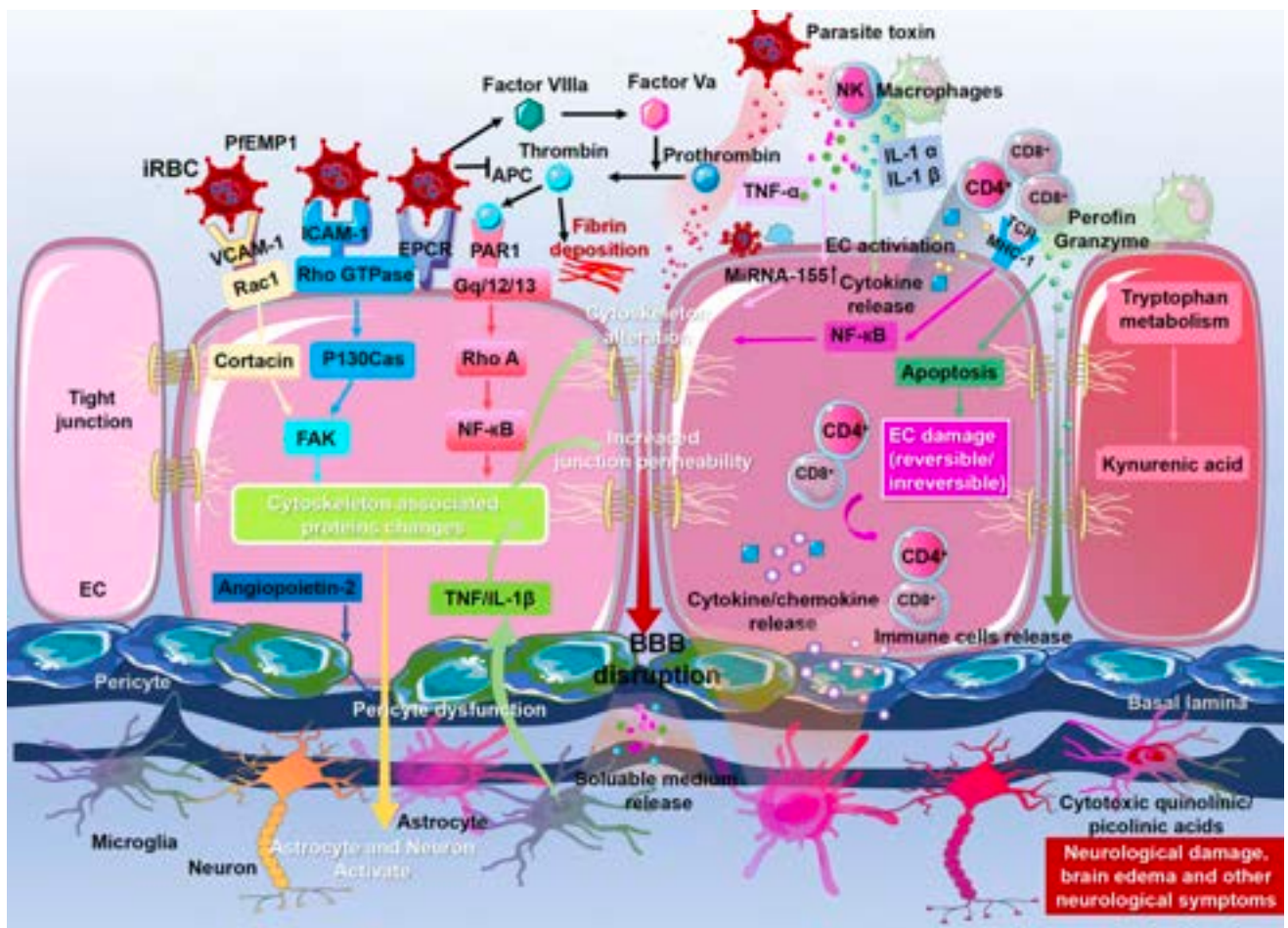


Figure 9 : Mécanismes moléculaires du dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique (87)

1.4. Synthèse de la physiopathologie du neuropaludisme

La séquestration des GRi dans les microvaisseaux cérébraux se produit par le biais d'interactions entre les protéines *PfEMP1* des GRi et les molécules d'adhésion cellulaire exprimées à la surface des cellules endothéliales. Cette cytoadhérence, combinée à d'autres phénomènes tels que le *rosetting* (agrégation de GRi et de globules rouges non infectés), le *clumping* (agrégation de plaquettes et de GRi), la diminution de déformabilité des globules rouges non infectés et des GRi, provoque une obstruction vasculaire entraînant un défaut de perfusion des tissus, une hypoxie, et crée ainsi un environnement local toxique, auquel s'ajoute la diminution de l'élimination des déchets parasites. La seconde conséquence de cette

séquestration des GRi dans les microvaisseaux est la libération de toxines et de facteurs parasitaires qui engendre le recrutement de cellules immunitaires comme les monocytes, les neutrophiles et les plaquettes qui produisent des médiateurs, notamment des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines pro-inflammatoires, peuvent avoir un effet local ou systémique délétère et sont responsables de l'activation des cellules endothéliales. Cette activation cellulaire (causée aussi par les GRi) peut aboutir à l'altération de l'homéostasie, à l'apoptose des cellules endothéliales, et à la rupture de la BHE (causée notamment par une augmentation de la perméabilité paracellulaire), rupture probablement suivie d'autres événements neuropathologiques secondaires au niveau du parenchyme cérébral, qui pourront aboutir à un œdème cérébral ou à un coma (Figure 10).

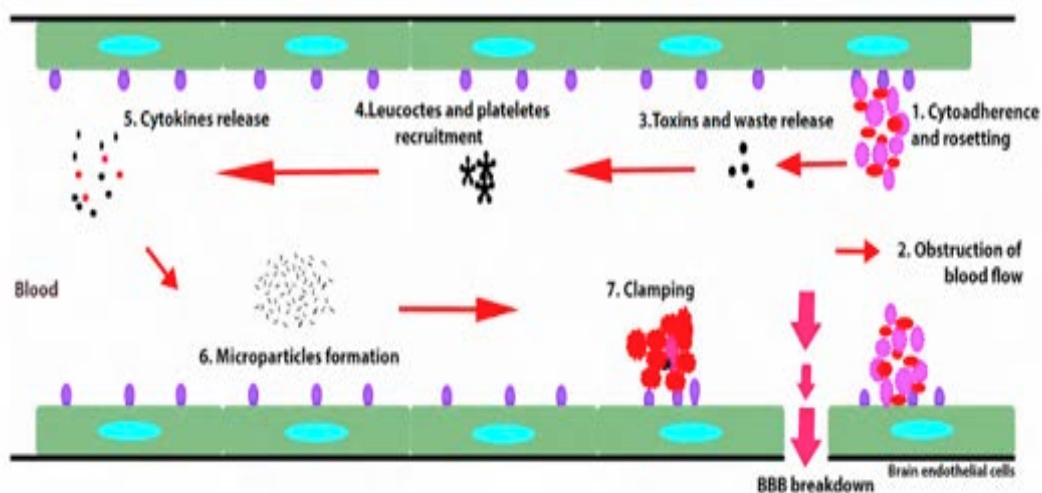


Figure 10 : Résumé schématique de la pathologie du paludisme cérébral (89)

2. Le rôle des monocytes dans la pathogenèse du neuropaludisme

Les monocytes sont un type de leucocytes dérivés des progéniteurs myéloïdes qui jouent un rôle crucial dans le système immunitaire inné et sont essentiels à la protection de l'hôte contre le paludisme. Les monocytes représentent environ 10 % des leucocytes chez l'homme et jouent deux rôles importants dans le système immunitaire. D'une part, ils régénèrent les macrophages et les cellules dendritiques résidents dans des conditions normales et, d'autre part, ils se déplacent vers les sites d'infection dans les tissus et se différencient en macrophages et en cellules dendritiques en réponse aux signaux d'inflammation. Ils circulent dans le sang avec une durée de vie de 1 à 2 jours, s'ils ne sont pas recrutés dans les tissus pour se différencier en macrophages. Lorsqu'ils sont activés, les monocytes contribuent à réduire la charge parasitaire par plusieurs mécanismes : 1) la phagocytose opsonique et non-opsonique des GRi, 2) la

présentation de l'antigène aux lymphocytes T, 3) la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS/RNI), 4) la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps et, 5) la production de cytokines inflammatoires. Cependant, les monocytes ont également été impliqués dans la pathogenèse de paludisme grave par la production excessive de cytokines inflammatoires entraînant une inflammation systémique et un dysfonctionnement vasculaire. Les réponses inflammatoires sont généralement classées en deux catégories de fonctions opposées : pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Les réponses pro-inflammatoires sont activées en présence de pathogènes et dans le but premier de les contenir et de les détruire (clairance parasitaire), tandis que les réponses anti-inflammatoires ont pour fonction de limiter l'inflammation et les lésions tissulaires qui en résultent, en favorisant l'homéostasie. Les médiateurs qui déclenchent les voies de la réponse inflammatoire doivent être étroitement contrôlés car leur activation excessive peut avoir des effets néfastes, et des études ont démontré que les altérations de l'équilibre entre l'inflammation et l'immunomodulation peuvent déterminer la réponse à l'infection (164). Dans cette partie de ma thèse, nous aborderons le rôle des monocytes dans la réponse antipaludique et leur contribution à la pathogenèse du neuropaludisme.

2.1. Les trois sous-populations de monocytes

Les monocytes constituent une population hétérogène et peuvent être classés en trois sous-populations en fonction de leurs niveaux d'expression de CD14 (corécepteur du LPS) et de CD16 (récepteur Fc γ III de faible affinité [Fc γ -RIII]). Chez les individus sains, les monocytes classiques (CD14⁺⁺CD16⁻) constituent le sous-ensemble prédominant du sang périphérique représentant 80 à 90% de la population totale de monocytes circulants. Les 10 à 20 % restants sont partagés entre les monocytes intermédiaires (CD14⁺⁺CD16⁺) et les monocytes non-classiques (CD14⁺CD16⁺⁺). Ces sous-ensembles varient en termes de propriétés de différenciation, de capacités migratoires et de production de cytokines. Les populations de monocytes CD16⁺ (intermédiaires et non classiques) semblent avoir des phénotypes pro-inflammatoires. Une proportion accrue de monocytes CD16⁺ a été détectée dans le sang périphérique de femmes enceintes infectées par le paludisme et co-infectées par le VIH et chez les patients souffrant de paludisme grave (165).

2.1.1. Les monocytes classiques

Sous-population de monocytes majoritairement présente dans la circulation sanguine, les monocytes classiques se caractérisent par une forte expression de CD14. Ils ont une nature plutôt pro-inflammatoire, avec la capacité d'infiltrer les tissus, de produire des cytokines inflammatoires solubles et de se différencier en cellules dendritiques et en macrophages

inflammatoires, faisant le lien entre les réponses immunitaires innées et adaptatives. Avec le CD14 impliqué dans la détection du lipopolysaccharide (LPS), ils répondent aux signaux bactériens par la production de cytokines et expriment des niveaux élevés de CCR2 qui se lie à CCL2 (MCP1) permettant aux monocytes de migrer vers le site de l'inflammation (166). Le CCL2 est produit par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales en réponse à des cytokines inflammatoires ou à des molécules microbiennes (167). Les monocytes classiques sont également considérés comme les phagocytes les plus performants parmi les sous-populations de monocytes. Ils expriment de nombreux récepteurs PRR (pattern recognition receptors) et participent à l'élimination des micro-organismes et des cellules apoptotiques par phagocytose (168). Les monocytes classiques réagissent fortement aux produits bactériens par l'intermédiaire du TLR4 et infiltrent les sites inflammatoires en réponse à la chimiokine CCL2. Ils semblent plus impliqués que les monocytes intermédiaires dans la production de ROS (169). Ces monocytes prolifèrent dans la moelle osseuse en réponse à une infection ou à une blessure. Par exemple, lors d'une infection bactérienne, ces monocytes migrent vers le site de l'infection, phagocytent les pathogènes et produisent une variété de chimiokines qui attirent d'autres cellules immunitaires et présentent des antigènes par l'intermédiaire du CMH de classe II. Les monocytes classiques CD14⁺ expriment des niveaux élevés de récepteurs de chimiokines tels que CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1 et CXCR2, ce qui indique leur capacité à migrer vers des signaux provenant de tissus lésés ou enflammés, mais ils se distinguent également par leur capacité à sécréter des molécules pro-inflammatoires telles que IL-6, IL-8, CCL2, CCL3 et CCL5 (170). Les monocytes classiques sont capables de se différencier en macrophages M1 pro-inflammatoires dérivés des monocytes et en cellules dendritiques et jouent un rôle important dans la régulation de l'inflammation et la réparation tissulaire (171).

2.1.2. Les monocytes intermédiaires

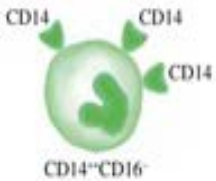


Les monocytes intermédiaires présentent une forte expression de CD14 et une faible expression de CD16. Ils ont une capacité à produire des ROS et à phagocyter similaire à celle des monocytes classiques, mais ils adhèrent moins à la surface cellulaire et expriment un niveau plus élevé de molécules de classe II et produisent plus d'IL-12 (172). Comme les monocytes classiques, l'expression de CD14 leur permet de répondre aux signaux bactériens. Ils expriment des niveaux élevés de CCR2, ce qui leur permet de se rendre à la fois sur les sites d'infection et dans les ganglions lymphatiques. Ils sont le seul sous-ensemble de monocytes à exprimer le CCR5, ce qui les rend aptes à la présentation d'antigènes, à la sécrétion de cytokines, à la régulation de l'apoptose et à la différenciation. Ils ont des niveaux élevés de gènes de

présentation d'antigènes tel que HLA-DR (173). Sur la base d'analyses génétiques et fonctionnelles, les monocytes intermédiaires sont plus proches des monocytes classiques que des monocytes non classiques et expriment davantage le CMH II, ce qui suggère qu'ils jouent un rôle important dans l'amorçage et la réponse des lymphocytes T. Les monocytes intermédiaires ont également des fonctions pro-inflammatoires en sécrétant de grandes quantités d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12, de TNF- α et de CCL3. Cependant, une étude sur les monocytes de donneurs sains a révélé que les monocytes intermédiaires sont les principaux producteurs d'IL-10 en réponse à la stimulation par le LPS (174).

2.1.3. Les monocytes non-classiques

Définis chez l'homme comme des monocytes présentant une faible expression de CD14 et une forte expression de CD16, les monocytes non-classiques sont considérés comme des monocytes "patrouilleurs". Leur rôle exact reste discuté mais ils diffèrent des monocytes classiques en ce qu'ils sont impliqués dans les processus de cicatrisation des tissus et l'angiogenèse. Ils expriment fortement le récepteur de la fractalkine (CX3CR1) et migrent également en réponse à une variété de chimiokines (175). Bien qu'une revue de *Wong et al* ait indiqué que les monocytes non-classiques sont peu phagocytaires, plusieurs travaux ont montré qu'ils avaient la capacité de phagocyter des particules *in vitro*, et des études d'expression génique ont montré un enrichissement pour les gènes liés à la phagocytose (173,175,176). Ils participent au recrutement des monocytes classiques et des neutrophiles sur le site de la lésion afin de mettre en place une réponse immunitaire plus importante. Ces monocytes sont capables de détecter et de répondre aux acides nucléiques et aux virus circulants via la signalisation TLR7 et TLR8, et de déclencher une réponse immunitaire innée en sécrétant des cytokines et des chimiokines. En outre, ils ont des fonctions antagonistes à celles des monocytes classiques et favorisent l'adhésion des neutrophiles à l'interface endothéliale via la sécrétion de TNF- α , mais ils ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires aux mêmes niveaux que les monocytes classiques. Le Tableau 1 résume les caractéristiques des trois sous-populations de monocytes.

Tableau 1 : Caractéristiques des sous-populations monocytaires

	Monocytes Classiques (CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻)	Monocytes Intermédiaires (CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺)	Monocytes Non-classiques (CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺)
			
Proportions	85%	5%	10%
Marqueurs de surface	CCR1, CCR2, CCR5, CXCR1, CXCR2	CCR2, CCR5, HLA-DR	CX3CR1
Fonctions	Pro-inflammatoire Phagocytose Production de ROS	Phagocytose Production de ROS	Patrouilleurs Réparation tissulaire
Production de cytokine	IL-6, IL-8, CCL2, CCL3 et CCL5	d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12, IL-10, TNF- α , CCL3	TNF- α

2.2. Rôle des monocytes dans la pathologie du neuropaludisme

Bien que la pathogenèse du neuropaludisme dans un modèle murin ne puisse pas être complètement représentative du neuropaludisme chez l'homme, elle fournit néanmoins des indications intéressantes sur les mécanismes pathologiques possibles conduisant à la neuroinflammation. Des études sur le neuropaludisme expérimental (ECM) ont montré que les monocytes sont principalement associés à la pathogenèse, sont une source majeure de cytokines pro-inflammatoires et sont impliqués dans l'accumulation de lymphocytes T CD8 dans le cerveau par la production de chimiokines (177). L'implication des monocytes dans la physiopathologie du neuropaludisme a également été mise en évidence à la fois chez l'homme et chez la souris où il a été démontré que les monocytes s'accumulent dans la microvasculature cérébrale dès l'apparition des symptômes neurologiques. Parallèlement, d'autres études sur l'ECM ont mis en évidence qu'une accumulation de GRi et de monocytes dans les capillaires cérébraux ne peut à elle seule expliquer la pathogenèse du neuropaludisme, mais que l'activation immunitaire de l'hôte en aval peut également jouer un rôle important (178–180). Le recrutement et la rétention des monocytes dans le système vasculaire cérébral favorisé par le facteur plaquettaire 4 (PF4) provoque une activation excessive des monocytes, contribuant ainsi à la pathologie du neuropaludisme (181). Une fois activés, les monocytes contribuent à réduire la charge parasitaire par la phagocytose, la production de cytokines, la présentation d'antigènes et la production des espèces réactives de l'oxygène qui participent également à l'apoptose des cellules endothéliales (6).

Les monocytes favorisent une cascade procoagulante, entraînant une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et la sécrétion de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, le TNF- α et l'IFN- γ , qui déclenchent un dérèglement de l'homéostasie dans le paludisme cérébral. Un autre facteur de l'hôte qui peut être crucial dans la pathogenèse du neuropaludisme est le fragment C5a, produit par l'activation du composant du complément C5. Le blocage de C5a ou des récepteurs de C5a sur les monocytes empêche la progression du neuropaludisme dans le modèle murin (182). Chez l'homme, des études *in vitro* ont montré que C5a agit en coopération avec le GPI pour activer les monocytes, ce qui entraîne la production de médiateurs pro-inflammatoires dont l'excès peut être associé à la pathologie. Les GRi entraînent également l'activation du complément, ce qui conduit au dépôt de fragments de C3b à la surface des GRi et à la communication avec les récepteurs du complément des monocytes. Les monocytes possèdent également des récepteurs Toll (TLR), qui aident à reconnaître les pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Les PAMPs qui peuvent directement activer les TLR exprimés par les monocytes comprennent les GPI, l'ADN/ARN parasitaire et les cristaux d'hémozoïne.

Dans une étude portant sur 133 enfants béninois présentant un spectre de paludisme clinique (42 neuropaludisme, 29 anémies sévères palustres et 62 paludisme simple), **Royo et al** ont rapporté qu'une diminution du pourcentage de monocytes non classiques était notablement liée au neuropaludisme et à la survenue du décès. Les auteurs ont constaté que les pourcentages de monocytes non classiques étaient beaucoup plus faibles chez les enfants atteints d'un neuropaludisme par rapport aux enfants présentant un paludisme simple (183). Des résultats similaires ont été obtenus par **Dobbs et al** chez des enfants atteints de paludisme simple en comparaison aux enfants sains du même âge (184). Dans une autre étude portant sur deux groupes d'enfants kényans (SMA et CM), le pourcentage de monocytes intermédiaires a augmenté (à l'inclusion) dans les deux groupes par rapport à la phase de convalescence, mais aucune différence n'a été constatée pour les monocytes non classiques (185).

Dans un modèle d'ECM, **Schumak et al** ont montré qu'une déplétion spécifique des monocytes inflammatoires Ly6C^{hi} a atténué la neuroinflammation et le recrutement de cellules immunitaires dans le système nerveux central (SNC), ce qui a permis de prévenir l'ECM à la suite d'une infection par *Plasmodium*, soulignant le rôle substantiel des monocytes Ly6C^{hi} dans les processus inflammatoires de l'ECM (186).

Il existe plusieurs mécanismes par lesquels les monocytes confèrent une protection aux personnes infectées par le paludisme (figure 11). Ils peuvent réduire le nombre de parasites en phagocytant les GRi par phagocytose opsonique ou non opsonique, produire des cytokines qui

alimentent ensuite les réponses inflammatoires, inhiber la croissance du parasite dans un processus connu sous le nom d'inhibition cellulaire dépendante des anticorps et enfin, produire des ROS/RNI. Les monocytes jouent donc un rôle clé dans les mécanismes de l'inflammation comme de sa résolution. Cependant, ils peuvent jouer également un rôle délétère dans la pathologie du neuropaludisme (183).

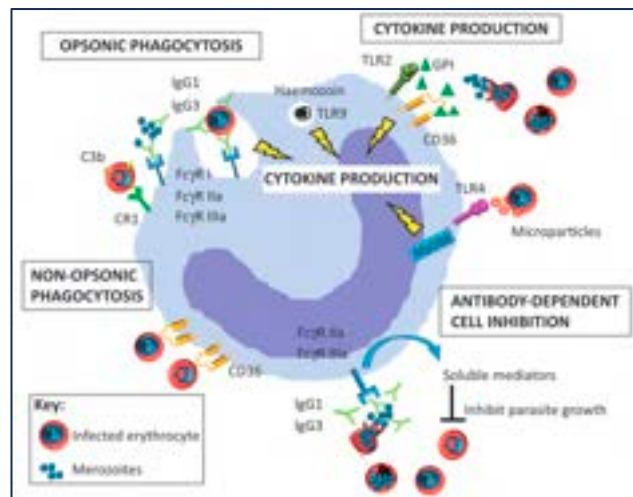


Figure 11 : Rôle des monocytes dans la protection contre le paludisme (158)

2.2.1. La phagocytose

La phagocytose est un processus essentiel de l'immunité innée permettant aux phagocytes d'internaliser et de digérer les pathogènes mais également les cellules infectées, vieillissantes ou apoptotiques ainsi que divers débris cellulaires. Les monocytes ont ainsi la capacité de détecter et phagocyter les GRi par *Plasmodium* et les mérozoïtes libres dans le sang via leurs récepteurs de surface « pattern recognition receptor » (PRR). Les PRRs sont des récepteurs de l'hôte capables de reconnaître directement les structures moléculaires spécifiques à la surface des agents pathogènes, des cellules hôtes apoptotiques et des cellules sénescents endommagés. On parle de phagocytose non-opsonique ou opsonique lorsque la reconnaissance de l'élément à phagocyter se fait respectivement de façon directe ou indirecte. Lors de la phagocytose (qu'elle soit directe ou indirecte), les mécanismes suivants sont mis en place :

- a) l'adhésion : par chimiotactisme, l'antigène parasitaire ou le parasite, préalablement fixé ou non à une opsonine, est reconnu par les récepteurs présents à la surface des cellules phagocytaires. Cela conduit à l'invagination de la membrane plasmique du phagocyte ;

- b) l'ingestion par endocytose : l'adhésion déclenche une réorganisation de la membrane du monocyte. Ce dernier va développer des prolongements cytoplasmiques appelés pseudopodes, qui vont entourer et internaliser le GRi ou le mérozoïte, créant ainsi une vacuole appelée le phagosome ;
- c) la digestion : c'est la fusion du phagosome avec des lysosomes pour former le phagolysosome permettant ainsi la digestion du parasite via les mécanismes d'acidification, d'hydrolyse, de production de ROS et de RNI ;
- d) l'expulsion : suite à la digestion parasitaire, les peptides sont présentés à la surface du monocyte par les molécules du CMH-I et II (présentation antigénique). Les monocytes jouent donc le rôle de cellules présentatrices d'antigènes (CPAg) et activent les LT déjà présents sur les sites inflammatoires contrairement aux cellules dendritiques, qui ont la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires.

Lors d'une infection palustre, la phagocytose des GRi et des mérozoïtes par les monocytes est un moyen efficace de réduire la parasitémie. Toutefois, son efficacité peut varier d'un individu à l'autre, ce qui se traduit par des degrés variables de protection et de susceptibilité au paludisme. Bien que *Bansal et al* aient démontré que les monocytes soient incapables de phagocyter les GRi par des gamétocytes matures (187), il existe des données contradictoires sur la capacité des monocytes à phagocyter les gamétocytes. Les gamétocytes passent par cinq stades de développement, du stade I au stade V ; les gamétocytes du stade précoce se trouvent dans la moelle osseuse, tandis que les gamétocytes du stade V tardif se trouvent dans le sang périphérique (188). En l'absence d'opsonines, il a été démontré que les monocytes et les macrophages humains phagocytent les gamétocytes des premiers stades I et II, tandis que les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris phagocytent les gamétocytes des premiers stades et des stades matures ; dans les deux cas, il s'agissait d'études *in vitro* (189,190). En revanche, les macrophages THP-1 n'ont pas pu phagocyter les gamétocytes qu'ils soient vivants, non opsonisés ou intra-érythrocytaires matures de stade V (187). Une éventuelle incapacité des gamétocytes matures à être phagocytés pourrait favoriser la transmission du paludisme. Les gamétocytes ont été précédemment détectés dans l'environnement extracellulaire de la moelle osseuse, d'où l'hypothèse d'une résistance à la phagocytose *in vivo*. L'utilisation de différents modèles de phagocytes qui peuvent avoir des niveaux d'expression différents des récepteurs phagocytaires tel que CD36 peut potentiellement expliquer ces résultats discordants ; néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour le vérifier.

2.2.1.1. La phagocytose non-opsonique

Au cours de la phase précoce de l'infection palustre, les monocytes se lient aux GRi via le récepteur CD36 et les englobent par phagocytose nonopsonique. L'adhésion des GRi au monocyte repose sur l'interaction CD36 - PfEMP-1. La liaison directe des GRi au récepteur CD36 des monocytes constitue une part importante de la protection immunitaire innée, en particulier chez les personnes immunologiquement dépourvues d'anticorps spécifiques du paludisme comme les enfants. Jusqu'à présent, seul CD36 a pu être directement impliqué dans la phagocytose non-opsonique des GRi. Une expérience de dégradation protéolytique de PfEMP-1 sur des GRi a conduit à une diminution de l'activité phagocytaire, suggérant le rôle clé de l'adhésion médiée par CD36 dans le processus de phagocytose non-opsonique des GRi. Le CD36 monocyttaire utilise les cascades de signalisation ERK et p38 MAPK pour participer activement à la phagocytose non-opsonique des GRi (176). Le niveau d'expression de CD36 sur les monocytes est tout aussi important pour déterminer l'efficacité de cette phagocytose. Une déficience en CD36 a été signalée dans les régions où le paludisme est endémique ; elle peut vraisemblablement empêcher la clairance précoce des GRi et accroître la sensibilité au paludisme. Cependant, dans les études cliniques, la déficience en CD36 a été associée à la fois à une sensibilité accrue et à une protection contre le paludisme (158). Ces résultats contradictoires peuvent être dus à la large expression de CD36 par divers types de cellules autres que les monocytes et à la diversité de ses rôles, notamment la séquestration des GRi dans la microvasculature. Un autre récepteur des monocytes, le CR1, pourrait être impliqué dans la phagocytose non-opsonique des GRi. En effet, les mérozoïtes peuvent dans certaines circonstances, se lier directement à CR1 exprimé par les érythrocytes, mais il n'a pas été vérifié que CR1 participe à l'absorption non-opsonique des mérozoïtes (191,192).

Il a été démontré *in vitro* que les monocytes intermédiaires et non-classiques d'enfants infectés par *P. falciparum* étaient plus efficaces dans la phagocytose des GRi que les monocytes classiques, avec un effet plus important observé 6 semaines après avoir reçu un traitement à l'artéméter-luméfántrine. Il est important de noter que cette activité était la plus élevée dans les monocytes intermédiaires, qui ont une expression plus importante de CD36, TLR2 et TLR4 (184). Les niveaux élevés des récepteurs susmentionnés expliquent potentiellement l'activité phagocytaire plus importante, étant donné qu'il a déjà été rapporté que la stimulation des TLR renforce la phagocytose non-opsonique médiée par CD36 (193). À ce jour, seules quelques études ont examiné la relation entre chaque sous-population de monocytes, leur potentiel de phagocytose et leur association avec la protection pendant l'infection par *Plasmodium spp.* Une augmentation des taux de monocytes intermédiaires hautement phagocytaires a été observé

chez des enfants kényans souffrant de SMA pendant la phase aiguë de la maladie en comparaison avec la convalescence (187). En revanche, dans une étude récente de *Royo et al* portant sur de jeunes enfants béninois, des taux plus faibles de monocytes non classiques ont été trouvés chez les patients décédés du paludisme et ces taux réduits ont été associés à une gravité accrue de la maladie, caractérisée par le développement d'une anémie sévère et d'un paludisme cérébral (183). Cependant, il reste à déterminer si cette protection contre la mortalité et la gravité de la maladie est attribuée à la capacité élevée de phagocytose des monocytes et à leurs réponses inflammatoires.

2.2.1.2. La phagocytose opsonique

La phagocytose opsonique ou indirecte implique l'interaction entre une molécule intermédiaire appelée opsonine (anticorps, composants activés du complément ou la protéine C-Réactive) et des récepteurs spécifiques présents sur la surface des monocytes et GRi. Comparée à la phagocytose non-opsonique, la phagocytose opsonique entraîne une plus grande élimination des GRi. Les anticorps antipaludiques humains sont naturellement acquis par l'organisme pour empêcher l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes au cours des infections palustres au stade sanguin. Toutefois, pour agir en tant qu'opsonine et favoriser une phagocytose efficace, les anticorps doivent être d'isotypes, de sous-classes et de spécificités particuliers. En utilisant des tests *in vitro*, il a été rapporté que l'opsonisation de la protéine circumsporozoïte (CSP) du sporozoïte et des GRi respectivement par les anticorps monoclonaux IgG4 et IgM diminuent leur phagocytose opsonique. D'autre part, l'immunité protectrice contre le paludisme est principalement associée aux sous-classes d'IgG1 et d'IgG3, réduisant le risque de développer un paludisme symptomatique (194,195). Ces deux anticorps peuvent se lier avec une forte avidité et affinité aux antigènes par l'intermédiaire de leur région Fab, et aux cellules immunitaires exprimant des récepteurs Fc via leur région Fc. La phagocytose opsonique des GRi nécessite la participation des récepteurs Fc γ et des facteurs du complément. Des anticorps spécifiques qui fonctionnent comme des opsonines sont produits pour faciliter la phagocytose en se liant aux Fc γ R tels que Fc γ RII (CD64), Fc γ RII (CD32) et Fc γ RIIIa (CD16). La liaison des anticorps à l'agent pathogène entraîne un dépôt de complément et une phagocytose médiée par les récepteurs Fc. Étant donné que diverses cellules immunitaires expriment différents sous-ensembles de Fc γ Rs, l'efficacité de la liaison de l'anticorps aux Fc γ Rs varie en fonction de l'isotype et de la cellule immunitaire à laquelle l'anticorps se lie. Lorsque le système du complément est activé, C3b et C4b agissent comme des opsonines qui ciblent les antigènes pour la phagocytose. Les antigènes parasitaires liés au complément se lient aux récepteurs du complément sur les monocytes et sont ensuite phagocytés par les monocytes.

Les proportions des monocytes intermédiaires et non-classiques peuvent être augmentées au cours d'une infection palustre (196) et semblent plus efficaces dans la phagocytose opsonique et non-opsonique des GRi. La phagocytose opsonique des GRi, des mérozoïtes et de l'ADN parasite par les monocytes entraîne la production de médiateurs pro-inflammatoires, ce qui n'est pas le cas de la phagocytose non opsonique. Dans une étude où les auteurs ont utilisé des monocytes d'individus naïfs de paludisme pour réaliser de la phagocytose opsonique *in vitro*, les monocytes intermédiaires se sont révélés être les plus efficaces. Cette étude a également indiqué que la phagocytose opsonique nécessite la participation du complément et du CD16, également connu sous le nom de FcγRIII qui se lie efficacement aux anticorps IgG1 et IgG3 (197). En utilisant des échantillons de sang d'enfants kenyans atteints de paludisme aigu, leurs monocytes intermédiaires et non-classiques ont montré une phagocytose opsonique des GRi significativement plus élevée que les monocytes classiques (184). Il est intéressant de noter que les monocytes intermédiaires de patients infectés par *P. vivax* ont également le potentiel phagocytaire le plus élevé lorsqu'ils sont confrontés à des réticulocytes infectés par *P. vivax* (198); cependant, on ne sait pas grand-chose des sous-ensembles de monocytes dans d'autres infections humaines à *Plasmodium spp.*

2.2.2. Inhibition à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCI)

L'ADCI, avec la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) qui est l'apanage des cellules NK, semble être un mécanisme de protection important associé à une réduction de la charge parasitaire. Ce mécanisme nécessite l'acquisition d'anticorps (sous-types IgG1 et IgG3) contre les antigènes de surface des mérozoïtes, notamment la « merozoite surface protein-1 » (MSP-1) bloc 2 et la « glutamate-rich protein » (GLURP). Ainsi, les antigènes de surface des mérozoïtes libérés lors de la rupture du schizonte, induisent une inhibition cellulaire dépendante des anticorps (ADCI) de *P. falciparum* à médiation monocyttaire, à condition que les mérozoïtes soient opsonisés par des anticorps de sous-types IgG1 et IgG3. Après avoir été exposés à des mérozoïtes opsonisés *in vitro*, les monocytes libèrent des médiateurs solubles (tels que les anti-MSP3) (199) qui inhibent la croissance et la prolifération des parasites environnants au stade érythrocytaire (200). L'ADCI nécessite l'interaction des complexes IgG-mérozoïtes avec les FcγR des monocytes comme l'a montré un test fonctionnel *in vitro*. L'ADCI se différencie de la phagocytose opsonique par l'absence d'internalisation du parasite.

Une étude précédente a démontré que le blocage de FcγRI n'avait aucun effet sur l'ADCI, tandis que le blocage de FcγRII ou FcγRIII pouvait inhiber l'ADCI. Les auteurs ont alors conclu que l'ADCI nécessitait l'engagement simultané de FcγRII et de FcγRIII (200,201). On ne sait pas

comment les polymorphismes de ces FcγR peuvent influencer les réponses à l'ADCI. Cependant, une sous-population particulière de monocytes (caractérisée par une forte expression de CD14, CCR2 et CX3CR1) pourrait être spécifiquement requise pour promouvoir l'ADCI. Cette population de monocytes est susceptible de faire partie du sous-ensemble mineur de monocytes CD16⁺ dans l'hôte humain (158). Une autre étude *in vitro* a montré une production de trappine-2 par les monocytes humains incubés avec des GRi par *P. falciparum* en présence d'IgG. La trappine-2 est une molécule qui se localise à la surface des mérozoïtes inhibant ainsi la croissance parasitaire. Dans un modèle de neuropaludisme expérimental, la surexpression de trappine-2 était corrélée à une réduction de la séquestration parasitaire augmentant ainsi la survie des souris (14).

2.2.3. La production de cytokines

En réponse à une infection par *Plasmodium*, les monocytes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, ce qui contribue à inhiber la croissance du parasite et à accélérer la clairance de l'infection, mais une production excessive contribue à la pathogenèse. Des études *in vitro* ont démontré que la production de cytokines par les monocytes en réponse aux stimuli de l'infection palustre peut être régulée par de nombreux facteurs, y compris les différentes voies de phagocytose des GRi. La phagocytose non-opsonique des GRi (via le récepteur CD36) des monocytes n'induit pas la production de TNF-α, même en présence d'agonistes des TLR (202). Cela contraste avec la phagocytose médiée par le FcγR (phagocytose opsonique) qui favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les réponses cytokiniques des monocytes peuvent donc différer entre les individus immunisés et non immunisés, ce qui pourrait contribuer à leurs différentes capacités à éliminer l'infection.

Stanisic et al ont démontré que les monocytes des enfants atteints de paludisme grave sécrétaient plus de TNF-α, de MIP-1β et de MIP-1α, cytokines impliquées dans l'activation et le recrutement des monocytes, que les enfants en bonne santé ou les enfants atteints de paludisme simple (203). **Dobbs et al** ont aussi montré chez des enfants souffrant de paludisme simple que des niveaux de cytokines plasmatiques pro-inflammatoires TNF-α, IP-10 (CXCL10), IFN-γ et IL-6 élevés par rapport aux enfants sains ou guéris, et une capacité altérée de phagocytose des GRi (184). Le TNF-α et l'IFN-γ régulent la phagocytose des GRi et l'activation des cellules endothéliales en augmentant l'expression d'ICAM-1 et d'autres molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (204).

Les composants associés aux parasites libérés dans la circulation sanguine après la rupture du GRi peuvent également déclencher la production de cytokines par les monocytes, en particulier par le biais de la signalisation TLR. En particulier, les glycosylphosphatidylinositols (GPI),

abondamment exprimés sur la surface du parasite et qu'ils soient liés au GRi ou qu'ils soient sous forme libre, peuvent se lier au récepteur TLR-2 sur les monocytes, tout en interagissant simultanément avec le récepteur CD36. Ces GPI stimulent une réponse pro-inflammatoire en augmentant la sécrétion de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 et d'oxyde nitrique (NO). Il a été démontré que les monocytes produisent de grandes quantités d'IL-12 et d'IL-18 qui empêchent la progression vers un paludisme grave. L'IL-18 et l'IL-12 agissent ensemble pour activer la production d'interféron γ (IFN- γ) par les lymphocytes T et les NK, qui est nécessaire à l'activation de la fonction pro-inflammatoire des monocytes afin de faciliter la clairance du parasite. Les interactions entre GPI et CD36 activent la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAP), favorisant la libération de cytokines pro-inflammatoires (205).

Il a aussi été démontré que les microparticules de la membrane plasmique du GRi activent les monocytes murins par les voies MyD88 et TLR-4. Le pigment du paludisme (ou hémozoïne), produit de la détoxification de l'hème libre par le parasite à l'intérieur des GRi, peut également moduler puissamment la production de cytokines par les monocytes. L'hémozoïne peut être absorbée par les monocytes à la suite de la phagocytose des GRi au stade mature ou de l'hémozoïne libre libérée à la suite de la rupture d'un schizonte (206). On ne sait pas quelles voies des monocytes sont impliquées dans la reconnaissance et la phagocytose de l'hémozoïne libre, mais les conséquences de cette phagocytose comprennent une augmentation rapide de l'expression du gène de l'IL-1 β , suivie par la transcription d'une série de cytokines (dont le TNF- α et l'IL-1 α) et de chimiokines (dont la protéine inflammatoire de macrophage-1 α (MIP-1 α), la MIP-1 β et la protéine chimioattractante de monocyte-1 (MCP-1)). L'hémozoïne synthétique, dépourvue d'ADN parasitaire, peut activer la voie de l'inflammasome Nalp3 dans les macrophages murins dérivés de la moelle osseuse, entraînant l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β . Il est intéressant de noter que l'absorption d'hémozoïne favorise la survie des monocytes en induisant l'expression de la protéine 27 du choc thermique (HSP27), une molécule qui peut protéger les cellules de l'apoptose (207). Cependant, la survie prolongée des monocytes, en particulier ceux dont la production de cytokines est dérégulée et dont la capacité phagocytaire est altérée, peut contribuer à de mauvais résultats cliniques.

2.2.4. La production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de dérivés nitrés (RNI)

Les monocytes/macrophages ne sont pas les seuls responsables de l'environnement oxydant au cours du neuropaludisme. Une étude a montré que l'absence d'expression de la NADPH-oxydase, une enzyme importante dans la synthèse des radicaux libres par les macrophages, n'entraînait aucune différence dans la progression de la parasitémie chez les souris pour toutes

les espèces de *Plasmodium* testées (*P. yoelii*, *P. chabaudi* K562, *P. berguei* ANKA, *P. berguei* K173, et *P. vinckei vinckei*). Ces résultats ont conduit les auteurs à penser que la production de radicaux libres par les macrophages n'est pas cruciale pour la clairance parasitaire, du moins dans un modèle murin (208). Selon les travaux de **Percário et al**, plusieurs facteurs induisent le stress oxydatif au cours d'une infection palustre : (a) la production de radicaux libres induite par le fer libre, conséquence de la digestion de l'hémoglobine par le parasite ; (b) la réponse inflammatoire de l'hôte déclenchée par le parasite ; (c) la génération directe de radicaux libres induite par le parasite ; (d) l'utilisation de médicaments antipaludiques ; (e) le syndrome d'ischémie et de reperfusion, causé par la cytoadhérence des GRi dans la microvasculature et l'anémie pendant l'infection (Figure 12) (209).

- a) *la production de radicaux libres induite par le fer libre, conséquence de la digestion de l'hémoglobine par le parasite* : L'infection à *Plasmodium* entraîne une forte production de ROS/RNI nocifs à la fois pour l'hôte et pour le parasite. Pour sa nutrition, *Plasmodium* dégrade l'hémoglobine à l'intérieur de l'érythrocyte pour utiliser ses acides aminés. La croissance rapide du *Plasmodium* dans l'érythrocyte ne dépend pas seulement de l'absorption nutritionnelle mais aussi de l'équilibre redox. Le fer libéré après digestion de l'hémoglobine réagit avec H₂O₂ par la réaction de Fenton (ou Haber-Weiss), s'oxydant et produisant des radicaux libres hautement toxiques, tels que le radical hydroxyle (OH[•]) et le superoxyde (O₂^{-•}). Dans ce processus, l'organisme augmente l'expression de la superoxyde dismutase (SOD) pour détoxifier le microenvironnement de la production d' O₂^{-•}, générant dans cette réaction encore plus d'H₂O₂ et d'OH[•] (210) ;
- b) *la réponse inflammatoire de l'hôte déclenchée par le parasite* : On assiste à une production de ROS/RNI lors de la libération d'hème libre suite à la lyse des GRi et lors de l'activation de la réponse immunitaire qui se traduit par la libération de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN-γ, le TNF-α et la LT-α par les cellules phagocytaires lors de la poussée respiratoire. De telles conditions dans les tissus pulmonaires et cérébraux augmentent la perméabilité microvasculaire, ce qui peut provoquer un syndrome pulmonaire associé au neuropaludisme (211). Le rôle du stress oxydatif dans l'élévation de la pression pulmonaire chez les enfants atteints de paludisme grave a également été démontré ; ce stress est causé par l'hémolyse intravasculaire et une diminution de la production d'oxyde nitrique (NO), ce qui entraîne un effet cardio-pulmonaire conséquent. En outre, **Na-Ek et Punsawad** ont

identifié une augmentation de l'expression du 4-hydroxynonéal (4-HNE) et de l'hème oxygénase-1 (HO-1) dans le tissu rénal des souris, deux marqueurs de dommages oxydatifs liés à des lésions tubulaires aiguës dans les reins lors d'un neuropaludisme expérimental (212). Au cours de l'infection palustre à *P. falciparum*, le stress oxydatif influence également la maturation et la fonction des cellules dendritiques (CD), en utilisant la xanthine oxydase (XO). Les ROS/RNI générés par la XO augmentent la sécrétion de cytokines induites par le parasite et l'expression de surface de CD80 dans les CD. Par conséquent, le stress oxydatif au cours de l'infection contribue à la réponse inflammatoire, avec une augmentation du nombre de cellules T CD4⁺ et des CD (213). Il convient de mentionner que l'activation des cellules T CD4⁺ par les CD donne lieu à des sous-ensembles de cellules T auxiliaires (Th), notamment Th1, Th2 ou Th17, conduisant à la production d'IFN- γ , d'interleukine-4 (IL-4) ou d'IL-17, respectivement. Cela suggère que la gravité de l'infection et la production de cytokines inflammatoires sont en corrélation avec les taux plasmatiques de XO chez les patients atteints de paludisme (214). Dans une étude menée par *Ty et al*, les ROS/RNI produits par la XO ont induit la production de cytokines inflammatoires par les macrophages et étaient corrélés avec le développement du neuropaludisme. En outre, les espèces réactives produites favorisaient également la production de pro-IL-1 β , tandis que les érythrocytes infectés par le parasite activaient l'inflammasome NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3), qui agit sur l'activation de la caspase 1, et le clivage et la libération consécutive d'IL-1 β bioactive (215). Dans un modèle d'ECM, l'expression des enzymes productrices d'eicosanoïdes chez les souris augmentait l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et de la 5-lipoxygénase (5-LOX) dans les vaisseaux et le tissu cérébral, mécanisme suivi par une plus forte expression du récepteur nucléaire PPAR- γ impliqué dans la réponse anti-inflammatoire, ce qui entraînait une augmentation de la parasitémie, une réduction de la survie et une diminution de la production de NO et de H₂O₂ chez ces animaux (216). Ainsi, les ROS/RNI participent à la balance pro-/anti-inflammatoire essentielle à la pathogénèse du paludisme et sa résolution ;

- c) *la génération directe de radicaux libres induite par le parasite* : Bien que peu explorés dans la littérature scientifique, les mécanismes de transport membranaire aérobie sont une source majeure de génération de ROS/RNI chez *Plasmodium* ;

- d) *l'utilisation de médicaments antipaludiques* : Un autre facteur qui génère un stress oxydatif au cours de l'infection palustre est le traitement lui-même, car les médicaments antipaludiques sont des sources pro-oxydantes. La méfloquine, par exemple, a un effet schizonticide sur le sang et, en interférant avec le processus de détoxification de l'hème, produit des ROS/RNI contre le parasite. Une étude *in vitro* a également démontré que la méfloquine agit en se liant aux protéases à cystéine, provoquant l'apoptose du parasite médiée par la production de ROS/RNI (217). Une étude évaluant les effets de la primaquine et de la chloroquine sur le stress oxydatif et les lésions de l'ADN chez les souris, a montré que la primaquine provoquait des lésions de l'ADN dans le cerveau et le foie, tandis que la chloroquine provoquait des lésions dans les reins, le foie et le cerveau, avec une augmentation des niveaux de malondialdéhyde (MDA) dans les deux cas, ce qui suggère que, pendant le traitement, ces médicaments induisent un stress oxydatif et des lésions de l'ADN (218). L'artémisinine et ses dérivés présentent également une activité antipaludique en induisant la production de ROS/RNI, qui oxydent les protéines et les lipides dans les érythrocytes infectés. En outre, l'artémisinine et ses dérivés, la dihydroartémisinine et l'artésunate, agissent en provoquant une dépolarisation rapide du potentiel membranaire du parasite, qui peut être inhibée par des antioxydants et des chélateurs du fer (219) ;
- e) *le syndrome d'ischémie et de reperfusion, causé par la cytoadhérence des GRi dans la microvasculature et l'anémie pendant l'infection* : En raison de la forte densité de GRi dans la microvasculature pulmonaire et cérébrale qui obstrue le flux sanguin, un syndrome d'ischémie et de reperfusion se produit, produisant une hypoxie dans ces tissus, qui est probablement responsable des lésions pulmonaires et cérébrales. Des ROS/RNI sont produits lors de la réoxygénation des tissus, ce qui accentue les dommages.

L'augmentation du stress oxydatif au cours du paludisme est responsable de lésions oxydatives systémiques et tissulaires, affectant des organes tels que les poumons et le cerveau. Le stress oxydatif dans le système nerveux central est lié au développement et à l'aggravation du paludisme. Ce déséquilibre redox a été associé aux manifestations les plus graves, telles que le neuropaludisme, et, selon les lésions du parenchyme cérébral, il peut entraîner des déficiences physiques et cognitives. Des études ont démontré une association entre les dommages oxydatifs causés par l'infection à *P. berghei* chez la souris et des lésions cérébrales, avec un dysfonctionnement physique et cognitif à long terme (220).

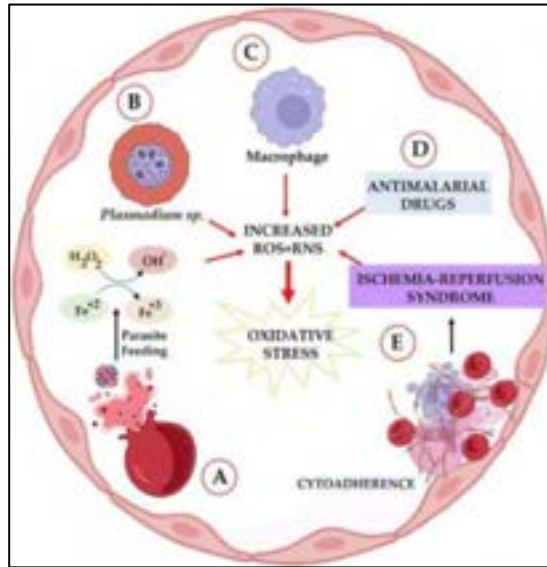


Figure 12 : Les sources du stress oxydatif au cours du paludisme (220)

3. Manifestations cliniques du neuropaludisme

Le neuropaludisme se caractérise cliniquement par une encéphalopathie diffuse avec des antécédents de fièvre pendant 2 à 3 jours, des crises d'épilepsie et une perte de conscience (coma). Des études antérieures ont mis en évidence des différences substantielles dans les manifestations cliniques du neuropaludisme chez les enfants et les adultes (Tableau 2). Bien que ces différences puissent être attribuées au statut immunitaire et à l'âge, de nombreuses questions restent en suspens. Le neuropaludisme pédiatrique se manifeste généralement par un coma, des crises d'épilepsie et une anémie sévère, tandis que l'insuffisance rénale et la détresse respiratoire se produisent rarement chez les enfants africains. Néanmoins, le neuropaludisme de l'adulte est fréquemment associée à de multiples complications organiques, notamment un dysfonctionnement du système nerveux central (SNC) et du foie, une insuffisance respiratoire et une insuffisance rénale aiguë (221).

Tableau 2 : Les manifestations cliniques du neuropaludisme chez l'enfant et l'adulte (87)

Caractéristiques cliniques		Enfants	Adultes
Symptômes précédents		Fièvre, refus de manger ou de boire, vomissements, toux et convulsions.	Malaise général, douleurs à la tête, au dos et aux membres, vertiges, anorexie, nausées, vomissements et diarrhée légère.
Système neurologique	Coma	Se développe rapidement, souvent après une convulsion, et dure 1 à 2 jours, réversible	Apparaît progressivement à la suite d'un délire, d'une désorientation et d'une agitation pendant 2 à 3 jours ou à la suite d'une crise d'épilepsie généralisée, qui dure plus longtemps
	Réflexe nerveux	Fréquent	Rare
	Déficiences neurologiques	Ataxie, hémiplégie, troubles de la parole et cécité. Troubles du comportement, hypotonie, spasticité généralisée	Psychose, ataxie, paralysies transitoires des nerfs crâniens, mononeurite multiple, polyneuropathie, tremblements extrapyramidaux et autres signes cérébelleux
Système de motorisation	Crises d'épilepsie	Fréquence élevée, Souvent partiel	Faible incidence, crises généralisées fréquentes, moins focales
	État de mal épileptique	Habituel	Rare
	Comportement anormal	Hyperactivité, impulsivité et inattention ou troubles du comportement	Ataxie de la démarche, tremblement intentionnel, dysmétrie, dysdiadococinésie, nystagmus et dysarthrie cérébelleuse
Complications systémiques		Hyponatrémie, anémie, hypoglycémie, ictère, acidose métabolique, détresse respiratoire, hépatosplénomégalie et pression intracrânienne.	Anémie, hypoglycémie, hémoglobinurie, jaunisse, choc, insuffisance rénale, acidose lactique sévère, saignements anormaux, œdème pulmonaire et syndrome de détresse respiratoire de l'adulte, respiration de Kussmaul.
Rétinopathie		Blanchiment de la rétine, décoloration orange ou blanche des vaisseaux rétiniens, hémorragies rétiniennes et, rarement, œdème papillaire.	Moins important. Caractérisé par des hémorragies rétiniennes et un blanchiment de la rétine, sans modification de la coloration des vaisseaux rétiniens.

4. Marqueurs biologiques du neuropaludisme

Outre les outils d'imagerie, les biomarqueurs peuvent être utilisés pour confirmer le diagnostic du neuropaludisme et estimer sa gravité. Un certain nombre de facteurs sérologiques permettant une discrimination précise du neuropaludisme après l'apparition des symptômes ont été décrits ces dernières années. Ces biomarqueurs sont indicatifs de la pathologie, car ils reflètent des processus spécifiques qui ont été associés au développement du neuropaludisme (89). L'activation des cellules endothéliales étant un événement primaire au cours du neuropaludisme, les biomarqueurs d'activation endothéliale peuvent être détectés plus tôt que les marqueurs traditionnels du paludisme et peuvent ainsi constituer des biomarqueurs précieux de diagnostic du neuropaludisme.

4.1. ICAM-1 soluble

Le rôle de la molécule d'adhésion ICAM-1 dans la séquestration des GRi est bien compris, et la liaison spécifique du GRi à ICAM-1 a été impliquée dans le développement du neuropaludisme. Aussi, des niveaux élevés d'ICAM-1 soluble dans le plasma ont été associés au développement du neuropaludisme chez les enfants ghanéens, et ces niveaux peuvent refléter la régulation à la hausse d'ICAM-1 dans la microvasculature cérébrale (89). ICAM-1 est un récepteur également présent à la surface des monocytes et lymphocytes. Dans ce cas, il est impliqué dans l'adhésion de ces cellules à l'endothélium ainsi qu'à leur transmigration à travers l'endothélium vasculaire (222). Dans une étude comparant l'expression d'ICAM-1 par les monocytes du sang périphérique et les concentrations plasmatiques d'ICAM-1 soluble chez des enfants atteints d'une infection à *P. falciparum* de divers degrés de gravité à Kampala en Ouganda, les patients atteints de neuropaludisme ou d'anémie palustre grave présentaient des taux d'ICAM-1 solubles plus élevés que les patients atteints de paludisme simple. Les niveaux d'ICAM-1 dans les monocytes étaient également plus élevés chez les patients atteints de paludisme cérébral que chez les patients atteints d'anémie palustre sévère (223). L'ICAM1 soluble, qui est fortement associé au neuropaludisme, a aussi été signalé comme étant régulé à la hausse dans la microvasculature cérébrale dans le modèle murin d'ECM (224). Ainsi, une augmentation des niveaux plasmatiques d'ICAM-1 soluble ainsi qu'à la surface des monocytes, bien que moins simple à doser, peut être prédictive du développement de complications cérébrales dans le neuropaludisme.

4.2. EPCR soluble

L'EPCR joue un rôle important dans la modulation de la coagulation sanguine, l'activation endothéliale et les propriétés de la BHE en renforçant l'activation de la protéine C par le complexe thrombine-thrombomoduline. L'infection palustre entraîne le blocage de la fonction

de l'EPCR par la cytoadhésion des GRi, ce qui peut être exacerbé par la perte de l'EPCR sur les sites de séquestration (161). Dans une étude sur des enfants béninois présentant différents tableaux cliniques de paludisme, le dosage immuno-enzymatique des niveaux d'EPCR soluble dans les échantillons de sang montre que les niveaux d'EPCR solubles étaient plus élevés à l'admission à l'hôpital que pendant la convalescence (225). Dans une autre étude, le niveau d'EPCR soluble à l'admission était positivement corrélé au neuropaludisme et à la mortalité liée au paludisme, et les niveaux d'EPCR solubles à l'admission ont été identifiés comme un biomarqueur précoce du pronostic chez les patients atteints de CM (224).

4.3. Rapport Ang-2/Ang-1

L'activation et le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire sont liés à la production de plusieurs biomarqueurs dont l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et l'angiopoïétine-2 (Ang-2). Ang-1 et Ang-2 ont été caractérisés comme des médiateurs de l'activation et de l'intégrité endothéliales. Ang-1 exerce de multiples effets protecteurs des vaisseaux, tandis qu'Ang-2 antagonise l'action d'Ang1 et déstabilise l'endothélium vasculaire. Ang-1 et Ang-2 se lient tous deux au récepteur Tie-2, qui fait partie de la famille des récepteurs vasculaires à tyrosine kinase. Dans des conditions normales, Ang-1 est présent à des concentrations élevées qui lui permettent de se lier au récepteur Tie-2, ce qui entraîne l'activation des voies de survie et l'inhibition de voies pro-inflammatoires. Cependant, après une infection, la libération rapide de l'Ang-2 lui permet de se lier préférentiellement au récepteur Tie-2 et favorise les voies pro-inflammatoires. Une concentration élevée d'Ang-2 dans le plasma a été observée chez les patients atteints de paludisme grave. Le rapport plasmatique Ang-2/Ang-1 reflète donc l'activation endothéliale et permet également de différencier le paludisme simple du CM (226). Une réduction de l'Ang-1 et une augmentation du rapport Ang-2/Ang-1 ont été détectées chez les patients atteints de CM, ce qui est cohérent avec les changements physiopathologiques d'activation et de dysfonctionnement des cellules endothéliales chez les patients atteints de neuropaludisme (227). Dans une étude comparant les niveaux sériques d'Ang-1 et d'Ang-2 chez des enfants présentant un paludisme simple ou un paludisme grave au groupe témoin constitué d'enfants non impaludés, *Oluboyo et al* ont montré que les sujets atteints de paludisme grave présentaient une augmentation significative de l'Ang-2 et du rapport Ang-2 : Ang-1, mais une diminution significative de l'Ang-1 (228). Aussi, selon des études réalisées chez des enfants africains souffrant de neuropaludisme, de faibles taux d'Ang-1 chez ces derniers à l'admission étaient associés au décès (4,148). Ainsi, les taux plasmatiques d'Ang-1 et d'Ang-2 peuvent prédire l'issue clinique du neuropaludisme.

4.4. Autres biomarqueurs pronostiques

Les chimiokines CXCL10 et CXCL4 ont été décrites comme un autre ensemble de biomarqueurs pronostiques dans le neuropaludisme. En effet, des taux plasmatiques élevés de ces chimiokines ont été associés de manière significative à la mortalité chez des patients atteints de neuropaludisme (229,230). On sait que CXCL10 est produite par une variété de cellules, y compris les cellules endothéliales bien que les effets de niveaux élevés de CXCL10 sur la microvasculature cérébrale soient encore méconnus. On soupçonne cependant qu'ils provoquent des lésions locales en recrutant des leucocytes mononucléaires (monocytes et lymphocytes), induisant une hyper-inflammation locale. CXCL4, quant à elle, est libérée par les plaquettes activées et stimule la production de TNF par les leucocytes mononucléaires, une cytokine pro-inflammatoire clé associée au développement du CM. La présence de PfHRP2 dans le LCR peut également être utilisée comme biomarqueur pour prédire le développement du neuropaludisme. En effet, en utilisant des échantillons de LCR et de plasma de patients du Malawi atteints de rétinopathie positive au neuropaludisme, il a été récemment démontré qu'un niveau plus élevé de PfHRP2 dans le LCR et des rapports PfHRP2 plasma/LCR plus faibles étaient prédictifs du décès chez les patients atteints de neuropaludisme avec rétinopathie (231).

5. Approches thérapeutiques du neuropaludisme

5.1. Thérapie antipaludique

Un traitement antipaludique standard précoce est crucial pour la prise en charge du neuropaludisme. Les dérivés de l'artémisinine, qui permettent une clairance parasitaire plus rapide que tous les autres médicaments antipaludiques, sont devenus les traitements de première intention pour traiter le paludisme grave, dont le neuropaludisme chez les enfants et les adultes (66). En 2011, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recommandé l'artésunate parentérale comme traitement de première intention pour le neuropaludisme. Bien que l'artésunate soit efficace pour éliminer les parasites, ce traitement ne suffit pas à protéger contre la mort cellulaire et les séquelles neurologiques. En outre, l'utilisation généralisée et à long terme de monothérapie constituée d'un dérivé de l'artémisinine peut conduire à l'émergence de souches résistantes à ces molécules, ce qui serait une catastrophe dans le cas de l'artésunate (86).

En effet, il n'existe pas aujourd'hui de médicament injectable en intraveineux aussi efficace pour l'élimination rapide des parasites, combinée au traitement des symptômes neurologiques. La gestion des convulsions est un autre traitement essentiel, car jusqu'à 70 % des enfants atteints de paludisme grave et cérébral ont des convulsions qui, lorsqu'elles sont traitées par

des benzodiazépines, risquent moins de provoquer des lésions neurologiques secondaires. En outre, la fièvre doit être contrôlée pour éviter les convulsions dues à une forte fièvre et des lésions neurologiques à long terme. Ainsi, la prise en charge classique du neuropaludisme combine classiquement l'artésunate, un antipyrétique et un anticonvulsivant par voie intraveineuse.

5.2. Thérapies adjuvantes potentielles

La thérapie adjuvante vise à améliorer la neuroprotection, principalement en réduisant la séquestration parasitaire (réduction de la cytoadhérence), ou en modulant les réponses immunitaires, ou enfin en améliorant les fonctions endothéliales. La physiopathologie du neuropaludisme est complexe et le ciblage d'une seule voie de signalisation peut s'avérer insuffisant pour réduire la mortalité ou améliorer la neuroprotection chez les patients atteints de neuropaludisme. Le ciblage de voies multiples, soit par l'utilisation d'interventions multiples (ce qui est plus compliqué à mettre en œuvre et augmente le risque d'effets indésirables, d'interactions médicamenteuses et de coûts), soit par l'utilisation d'une intervention unique ciblant des voies multiples impliquées dans la pathologie du neuropaludisme, pourrait potentiellement conduire à une amélioration des résultats. Une thérapie d'appoint efficace doit être sûre (non toxique), présenter un avantage évident par rapport à l'utilisation d'antipaludiques seuls, être efficace en tant qu'intervention tardive, être peu invasive, peu coûteuse et, dans l'idéal, pouvoir être mise en œuvre dans les régions endémiques à faibles ressources, où se produit la majeure partie des infections à *Plasmodium*. L'objectif de la thérapie d'appoint devrait être l'amélioration du résultat clinique et/ou la réduction de la mortalité, en plus, si possible, de la prévention des déficits neurocognitifs à long terme. Des études ont montré l'efficacité de la thérapie adjuvante dans la réduction de la mortalité due au CM dans les modèles d'ECM (232–238).

Chez l'homme, de nombreuses tentatives de développement de thérapies ciblant les séquelles neurologiques ont échoué ou ont même augmenté l'incidence des séquelles indésirables, comme l'ont analysé *Varo et al* (239). Il n'existe donc pas actuellement de thérapies neuroprotectrices complémentaires efficaces. Ces études de thérapies adjuvantes se sont principalement concentrées sur :

- *la diminution de la séquestration parasitaire*. La protéine PfEMP1 est connue pour son affinité à adhérer aux récepteurs des cellules endothéliales de l'homme (notamment CD36, ICAM-1, VCAM-1, PECAM, CR1, CSA). La cytoadhérence des GRi à l'endothélium entraînant leur séquestration dans les microvaisseaux peut donc être ciblée (en empêchant les GRi de se lier à l'endothélium vasculaire ou de l'activer) pour

une survie des enfants atteints de neuropaludisme. Dans des modèles d'ECM, l'utilisation de la rapamycine limite la cytoadhérence des GRi aux cellules endothéliales en réduisant l'expression de VCAM-1 et d'ICAM-1 (240). Dans une autre étude sur le modèle murin, l'association de la dihydroartémisinine avec la rapamycine et l'atorvastatine a permis de réduire la morbidité et les séquelles neurologiques du neuropaludisme (238). Il a aussi été constaté que le lévamisole, un antihelminthique utilisé pour le traitement des infections parasitaires diminuait la séquestration parasitaire en interrompant la liaison des GRi aux récepteurs des cellules endothéliales de l'homme (241,242). Toutefois un essai contrôlé randomisé réalisé au Bangladesh, qui a étudié l'effet d'une dose unique de chlorhydrate de lévamisole (150 mg par voie orale, en une seule prise) chez des patients adultes atteints de paludisme sévère n'a montré aucun avantage par rapport au placebo lorsqu'il était administré comme adjuvant à l'artésunate par voie intraveineuse (239) ;

- *l'inflammation*. Bien qu'une balance entre la réponse pro- et anti-inflammatoire soit essentielle à l'élimination des parasites et à la résolution de l'inflammation générée par l'infection palustre, la plupart des thérapies adjuvantes testées visent à diminuer la réponse pro-inflammatoire. En outre, ces thérapies adjuvantes se sont jusqu'à présent révélées inefficaces pour réduire la mortalité et prévenir les conséquences neurologiques négatives. Par exemple, le traitement des patients atteints de CM par la dexaméthasone, couramment utilisée pour traiter d'autres troubles neurologiques en réduisant l'inflammation et l'œdème vasogénique, a en fait entraîné une prolongation du coma et une augmentation des complications neurologiques (243). Les thérapies adjuvantes visant à contrer l'œdème cérébral avec le diurétique osmotique mannitol, connu pour abaisser la pression intracrânienne, n'ont montré aucun effet bénéfique chez les patients atteints de neuropaludisme (163). Ciblant également l'inflammation, le traitement par anticorps monoclonal anti-TNF a aggravé l'évolution du neuropaludisme et augmenté l'incidence des séquelles neurologiques post-neuropaludisme. Bien que la réduction pharmacologique des niveaux de TNF à l'aide de la pentoxifylline, un inhibiteur de la phosphodiesterase, ait montré une légère amélioration de la survie chez l'homme dans certaines études, d'autres n'ont montré aucun bénéfice sur les résultats cliniques, ou ont même conduit à une augmentation de la mortalité lorsqu'elles ont été étudiées chez les enfants (239,244–247). Cependant, certaines données obtenues dans le modèle murin démontrent que la régulation de l'équilibre immunitaire peut être efficace pour le traitement du neuropaludisme. En effet, la modulation de l'activation

de mTORC1 (Mechanistic target of rapamycin complex 1) dans les cellules T CD4+ et CD8+ entraîne une augmentation du nombre de cellules T actives dans la rate et une diminution dans le cerveau, soutenant ainsi le potentiel de la rapamycine en tant que traitement adjuvant pour la CM (248). Enfin, la 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), un analogue de la glutamine, s'est avérée efficace pour bloquer la conversion de la glutamine en glutamate, inhibant ainsi l'activation des lymphocytes T chez des souris dans un modèle d'ECM (249,250) ;

- *réduction de la biodisponibilité en fer* : Un chélateur du fer comme la déféroxamine pourrait avoir une activité antipaludique grâce à son action de rétention du fer du parasite, un élément crucial pour ses voies métaboliques. En outre, la déféroxamine inhibe les dommages peroxydés induits par le fer sur les cellules et les structures subcellulaires, ce qui peut constituer un autre effet bénéfique pour les patients atteints de paludisme grave à *P. falciparum*. Des études portant sur la déféroxamine (251) et le chélateur du fer oral déféripone (252) n'ont montré aucune différence en termes de mortalité chez les enfants atteints de CM (déféroxamine) ou chez les adultes atteints de paludisme grave (déféripone). En revanche, dans les deux études, les temps de clairance des parasites étaient plus courts dans le groupe traité par le chélateur du fer. Cependant, la plus grande étude réalisée à ce jour sur la déféroxamine, une étude multicentrique en Zambie, a montré une tendance à l'augmentation de la mortalité avec la déféroxamine dans l'un des sites de l'étude (253). A l'heure actuelle, il n'existe pas suffisamment de preuves de l'utilité des chélateurs du fer dans la prise en charge du paludisme grave (247) ;
- *le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale*. Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été proposées pour cibler le dysfonctionnement endothélial, y compris un antagoniste du récepteur du facteur d'activation des plaquettes (254). Ainsi, des statines telles que l'atorvastatine, la lovastatine, la protéine C activée et l'érythropoïétine ont été testées. Dans un modèle d'ECM, l'association de l'atorvastatine et de la mefloquine a permis de retarder de manière significative la mortalité des souris infectées par *P. berghei ANKA* avec un effet significatif sur l'inhibition de la croissance parasitaire *in vivo* et l'évolution clinique des souris (255). Selon *Reis et al*, le traitement des souris à la lovastatine et à la chloroquine prévient la neuroinflammation et le dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique dans un modèle d'ECM (256). La protéine C activée a aussi été proposée comme thérapie adjuvante après avoir découvert qu'EPCR jouait un rôle clé dans la médiation des effets cytoprotecteurs induits par la protéine C

activée, notamment des effets antiapoptotiques, anti-inflammatoires et la stabilisation de la BHE (257). Une autre approche testée est l'injection de l'érythropoïétine à des souris infectées par *P. berghei ANKA* ; cette approche a permis d'améliorer la survie de souris et démontré que les inoculations à la souris d'érythropoïétine humaine recombinante (rHuEPO) au début des manifestations cliniques du neuropaludisme augmentent la survie des souris à plus de 90% (257,258).

En outre, il a été rapporté que l'angiopoïétine (Ang-1 et Ang-2) régule l'intégrité de la BHE et est associée à la rétinopathie et à la survenue de décès dus au neuropaludisme. En réponse à la stimulation par le TNF, l'Ang-2 provoque la destruction de l'intégrité de la BHE et déclenche l'expression des molécules d'adhésion endothéliales. La sécrétion d'Ang-2 dans les corps de Weibel-Palade endothéliaux peut entraîner une fuite vasculaire, une inflammation et un encéphalogramme associés au neuropaludisme. Une thérapie ciblant l'endothélium qui inhibe la sécrétion extracellulaire de Weibel-Palade peut bloquer l'activité autocrine pathogène de l'Ang-2. L'extrait éthanolique fongique de *Trichoderma stromaticum* contribue aussi à réduire l'inflammation dans le cas du neuropaludisme expérimental en réduisant l'expression de VCAM-1 et ICAM-1, protégeant ainsi l'intégrité de la BHE (87).

5.3. Thérapies adjuvantes ciblant les monocytes

Une meilleure compréhension des interactions moléculaires entre les monocytes et les GRi peut contribuer à la conception de nouvelles thérapies visant à moduler les réponses des monocytes et à améliorer la prise en charge du neuropaludisme. Diverses thérapies complémentaires ont été explorées, notamment les agonistes du peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ), comme la rosiglitazone, et les activateurs du Nrf2, qui visent tous deux à réduire la parasitémie en favorisant la phagocytose non-opsonique par l'augmentation de l'expression de CD36 par les monocytes (259,260). Dans un essai randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo, de phase I/II réalisé en Thaïlande chez des sujets présentant un paludisme simple, le traitement à la rosiglitazone a augmenté la clairance des parasites et a diminué les biomarqueurs inflammatoires associés aux conséquences négatives du paludisme (260). Dans un modèle d'ECM utilisant la souche *Plasmodium berghei ANKA*, la rosiglitazone modifiait la réponse inflammatoire à l'infection palustre et améliorait le taux de survie des souris même lorsque le traitement était initié jusqu'au cinquième jour après l'infection. En outre, la rosiglitazone a réduit la parasitémie en favorisant la phagocytose non-opsonique via une régulation positive du CD36 sur les monocytes (261,262).

Plusieurs thérapies visant à atténuer les réponses des monocytes ont également été proposées. Le défibratide est un traitement d'appoint potentiel pour le neuropaludisme; il a été proposé pour bloquer l'expression du facteur tissulaire par les cellules endothéliales et de prévenir la coagulation sanguine. Cependant, le défibratide peut également avoir un effet sur les monocytes/macrophages, soit en bloquant de manière similaire l'expression du facteur tissulaire, soit en diminuant la production d'anion superoxyde. L'oxyde nitrique inhalé s'est révélé bénéfique dans le modèle murin d'ECM mais n'a pas montré d'effet chez l'enfant souffrant de neuropaludisme, bien que son inhalation était sans danger (152).

L'oxyde nitrique peut réduire efficacement l'activation immunitaire et à forte concentration inhiber la production de cytokines par les monocytes/macrophages, ce qui pourrait à son tour prévenir les lésions inflammatoires dans le neuropaludisme. Étant donné que de nombreuses manifestations graves du paludisme résultent d'une accumulation accrue de monocytes sur le site de l'infection, des inhibiteurs ciblant les récepteurs de chimiokine des monocytes pourraient être étudiés pour empêcher la migration des sous-populations de monocytes.

Le Tableau 3 présente un résumé des différents essais cliniques randomisés (ECR) réalisés avec des thérapies adjuvantes sur une période de 33 ans (de 1982 à 2015). Seuls les ECR réalisés chez des patients souffrant de neuropaludisme sont résumés dans ce tableau. Les ECR qui ne présentaient pas de données sur les résultats cliniques ou qui ont été réalisés chez des patients ne souffrant pas de cérébral ont été exclus.

Tableau 3 : Liste des essais cliniques randomisés sur les traitements d'appoint dans les cas de neuropaludisme (239)

Antipaludique	Thérapie adjuvante	Dosage	design de l'étude*	Age	Résultats
Immunomodulation					
Quinine en IV	Dexaméthasone en IV	Enfants : 0,6 mg/kg, suivi de 7 doses de 0,2 mg/kg à 6 heures d'intervalle Adultes : 0,5 mg/kg, suivi de 7 doses de 10 mg chacune (durée du traitement 48 h)	RCT, DB, PC	6 à 70 ans	Pas de réduction de mortalité. Risque accru d'effets indésirables (coma prolongé, pneumonie et hémorragie gastro-intestinale).
Quinine en IV	Dexaméthasone en IV	dose initiale, 3 mg/ kg ; total, 11,4 mg/ kg par 48 h	RCT, DB, PC	1,6 à 42 ans	Aucune différence en termes de mortalité, de temps d'élimination des parasites et de la fièvre ou d'incidence des complications.
Quinine et artéméther en IM ± sulfadoxine pyriméthamine en oral	anti-TNF mAb en IV	5 mg/kg pendant 15 min	RCT, DB, PC	1 à 9 ans	Aucune différence dans la mortalité, la récupération du coma ou les complications. Temps d'élimination de la fièvre plus faible. Tendance à une élimination plus rapide des parasites. Taux plus élevé de séquelles neurologiques
Quinine en IV	Pentoxifyline en IV	10 mg/kg/24, 72 h	RCT	< 14 ans	La baisse de la mortalité n'est pas statistiquement significative. Résolution significative du coma
Quinine en IV	Pentoxifylline en IV	10 mg/kg/24, 72 h	RCT	> 18 ans	Amélioration de la mortalité, non statistiquement significative. Réduction significative du temps de récupération du coma
Quinine IV + doxycycline ; 2. méfloquine ou halofantrine par voie orale	Pentoxifylline en IV	5 mg/kg/24 h pendant 5 jours	RCT, DB, PC	22 à 69 ans	Aucune différence en termes de mortalité, de résultats cliniques ou de paramètres de laboratoire. Plus d'effets secondaires
Quinine en IV	Pentoxifylline en IV	10 mg/kg/24 h pendant 72 h	RCT, DB, PC	9 mois à 8 ans	Mortalité plus élevée. Pas de différence dans la récupération du coma, l'incidence des complications ou les séquelles neurologiques. Tendance à l'accélération de la fièvre et de la disparition des parasites.

Antipaludique	Thérapie adjuvante	Dosage	design de l'étude	Age	Résultats
Limitation de la disponibilité du fer					
Quinine en IV + sul fadoxine pyriméthamine orale	Déferoxamine en IV	100 mg/kg/day pendant 72 h	RCT, DB, PC	20 à 54 mois	Mortalité plus faible, non statistiquement significative. Temps de récupération du coma et d'élimination des parasites plus rapide
Quinine en IV	Déferoxamine en IV	100 mg/kg/day pendant 72 h	RCT, PC	< 6 ans	Tendance non significative à une récupération plus rapide du coma. Pas de différence statistique dans la mortalité
Prévention des convulsions					
Quinine en IV	Phénobarbital en IM	3.5 mg/kg, dose unique	RCT, DB, PC	6 - 78 ans	Moins de convulsions
Quinine en IV	Phénobarbital en IM	20 mg/kg, dose unique	RCT, DB, PC	19 - 65 mois	Moins de convulsions. Mortalité plus élevée
Diminution de la pression intracrânienne					
Quinine en IV	Mannitol en IV	1 g/kg	RCT, DBO, PC	6 - 60 mois	N'a pas réduit de manière significative le temps nécessaire pour reprendre conscience, la durée d'inactivité ou la mortalité.
	Mannitol en IV	1,5 g/kg en 15 minutes, suivi de 0,5 g/kg toutes les 8 heures jusqu'à ce que le patient reprenne conscience ou pendant une période maximale de 72 h	RCT, OL, PC	25 - 31 ans	Tendance à une mortalité plus élevée dans le groupe mannitol. Le mannitol a prolongé la sortie du coma
Correction de l'acidose lactique					
Artesunate en IV	Oxyde nitrique	inhale, 80 ppm	RCT, OL, PC	2 mois à 2 ans	Pas augmentation d'Ang- 1, pas réduction de mortalité. Résultats cliniques et séquelles neurologiques similaires entre les groupes.

*RCT= randomized controlled trial = essai randomisé contrôlé ; DB=Double-blind=Double aveugle ; PC=Placebo-controlled= contrôlé par placebo ; OL=Open-label=Essai ouvert ou sans insu

III. Problématique

La physiopathologie du neuropaludisme est complexe et multifactorielle. La cytoadhérence des GRi par *P. falciparum* provoque une obstruction microvasculaire, une ischémie et une hypoxie, une activation et une signalisation endothéliale, une altération de la BHE et une série de réponses immunitaires de l'hôte pour résoudre le processus de neuroinflammation. Les acteurs de l'hôte impliqués dans le processus de neuroinflammation comprennent les cellules endothéliales de la BHE, les astrocytes, la microglie, les neurones et les cellules immunitaires infiltrantes qui migrent vers le site inflammatoire. En bref, l'ischémie cérébrale aiguë entraîne l'activation de la microglie et l'afflux de cellules immunitaires myéloïdes dans le cerveau. La microglie résidente et les monocytes/neutrophiles infiltrés jouent un rôle essentiel dans le déclenchement, le maintien et la résolution de l'inflammation post-ischémique (263). Cependant, la guérison du neuropaludisme dépend à la fois de l'élimination du parasite et de la résolution de l'inflammation cérébrale. L'artésunate, un dérivé de l'artémisinine caractérisé par un temps d'élimination du parasite le plus rapide de tous les médicaments antipaludiques, est devenu le traitement de première intention pour traiter le paludisme grave et le neuropaludisme chez les enfants et les adultes (66). Cependant, l'artésunate ne suffit pas à protéger contre la mort cellulaire et les séquelles neurologiques. Des thérapies combinées sont donc nécessaires pour améliorer les résultats cliniques. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés sur deux acteurs essentiels de la neuroinflammation et sa résolution : l'endothélium et la réponse monocytaire.

Au niveau des cellules endothéliales de la micro-vascularisation cérébrale, la séquestration des GRi est un mécanisme majeur de la survenue du neuropaludisme. Néanmoins son interrelation avec l'activation endothéliale compromettant l'intégrité vasculaire au cours du neuropaludisme via la sécrétion de marqueurs d'activation endothéliale tels que l'ang-2 et le vWF reste encore mal documentée. S'il existe bien une implication de la séquestration parasitaire et de l'activation endothéliale dans la survenue du neuropaludisme, quelle est l'influence de la séquestration parasitaire sur cette activation ? De plus, la séquestration parasitaire varie-t-elle en fonction du phénotype des GRi ? Enfin, un contact direct (GRi et cellules endothéliales) est-il nécessaire pour induire l'activation endothéliale ? Dans la première partie de cette thèse, nous essaierons de répondre à ces questions au travers des hypothèses suivantes : la séquestration parasitaire influence l'activation endothéliale, le phénotype des GRi module leur adhésion à

l'endothélium et l'activation de ce dernier, l'activation de l'endothélium se fait par contact cellulaire.

Par ailleurs, des projets antérieurs de l'équipe sur le neuropaludisme (chez l'enfant et dans des modèles murins expérimentaux) ont permis de montrer que parmi les trois sous-populations de monocytes (classiques, intermédiaires et non-classiques), des pourcentages réduits de monocytes non-classiques étaient associés au décès, suggérant que cette sous-population de monocytes joue un rôle dans la résolution de la neuroinflammation par un phénotype anti-inflammatoire combiné à une surexpression de CD16 (183). Il est aussi probable que les différentes sous-populations de monocytes exercent également des fonctions immunologiques distinctes au cours de l'infection palustre. Dans ces mêmes travaux, *Royo et al* ont montré qu'une expression réduite de CD36 par les trois sous-populations de monocytes était caractéristique du neuropaludisme, en comparaison à des groupes de paludisme simple et anémie palustre. En outre, la faible expression de CD36 par les monocytes non classiques était associée à la survenue de décès au cours du neuropaludisme. Les travaux de *Royo et al* sur le modèle murin ont permis de confirmer un lien entre la surexpression de CD36 et la résolution du neuropaludisme (177). Etant donné l'implication de CD36 dans la phagocytose des GRi, nous avons formulé l'hypothèse de l'importance de la phagocytose via CD36 au cours du neuropaludisme. C'est pourquoi la deuxième partie de ce travail est consacrée à la capacité de phagocytose des monocytes au cours du neuropaludisme, en comparaison au paludisme simple, au niveau fonctionnel et moléculaire, pour une meilleure compréhension de ce mécanisme dans les trois sous-populations de monocytes et de son rôle dans la pathogénèse.

Enfin, l'infection palustre est accompagnée d'une réponse immunitaire de l'hôte. L'importance de la réponse pro- et anti-inflammatoire dans la physiopathologie du neuropaludisme a bien été rapportée dans la littérature. En effet, les cytokines de par leur propriétés pro/anti inflammatoires modulent le microenvironnement local, les chémokines quant à elles sont capables de recruter et d'activer diverses cellules immunitaires (monocytes, lymphocytes, neutrophiles, cellules endothéliales) sur le site de l'inflammation. Si la production de cytokine/chemokine pro-inflammatoires est nécessaire à l'élimination des GRi et à l'efficacité de la réponse immune, une production croissante et incontrôlée de cytokine/chémokine induit une aggravation de la neuroinflammation. A ce jour, plus de 30 cytokines ont été décrites comme associées à la pathologie palustre. En effet, des concentrations plasmatiques élevées de CCL2, CCL4, CXCL4, CXCL8, CXCL10, IL-1RA, IL-6, TNF- α et G-CSF sont détectées chez les patients souffrant de neuropaludisme et les niveaux plasmatiques de CCL2, CCL4, CXCL4, CXCL8, CXCL10 et CCL3 étaient directement corrélés à la gravité de l'infection. Cependant,

les données de la littérature ne sont pas unanimes quant aux marqueurs d'aggravation clinique du neuropaludisme. Ainsi, dans la troisième et dernière partie de cette thèse, nous caractériserons l'importance des réponses pro- et anti-inflammatoires dans la physiopathologie du neuropaludisme dans le but d'identifier les facteurs prédictifs de décès ou de survie au cours du neuropaludisme.

Dans ce contexte, les études ciblant une meilleure compréhension des interactions moléculaires entre les cellules endothéliales du cerveau et les GRi d'une part et la fonctionnalité des monocytes au cours du neuropaludisme d'autre part, peuvent contribuer à la conception de nouvelles thérapies visant à moduler les réponses des monocytes/macrophages et des cellules endothéliales du cerveau et à réduire la mortalité et prévenir les troubles neurocognitifs à long terme.

Ma thèse intitulée « analyse du système hôte-parasite chez le patient pour un traitement adapté du neuropaludisme » a pour objectif général d'identifier les facteurs parasitaires et cellulaires impliqués dans les interactions hôtes-parasites délétères pour le patient. Elle s'inscrit dans le projet NEUROCM. L'étude NEUROCM est un projet financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR 2017-2022) qui vise à identifier les facteurs de l'hôte et du parasite à l'origine de la neuroinflammation et de sa résolution dans un contexte de neuropaludisme. Pour ce faire, un recrutement d'enfants souffrant de paludisme simple et de neuropaludisme a été mis en place au Bénin en 2018.

Les objectifs spécifiques de ma thèse sont les suivants :

- 1) étudier *ex-vivo* l'activation différentielle des cellules endothéliales par des isolats de patients présentant soit un neuropaludisme soit un paludisme simple ;
- 2) décrire la fonctionnalité des sous-populations monocytaires chez les patients présentant soit un neuropaludisme soit un paludisme simple ;
- 3) identifier des marqueurs plasmatiques et urinaires du risque de neuropaludisme et de décès.

La première partie de ma thèse a servi à présenter les généralités sur l'infection palustre et sur le neuropaludisme avec un accent particulier sur le rôle des cellules endothéliales et des monocytes dans la physiopathologie du neuropaludisme. Dans la seconde partie de ma thèse je présenterai sous d'articles mes différents travaux de recherche et je finirai par une discussion générale suivie des conclusions et perspectives.

PARTIE 2 : TRAVAUX DE RECHERCHE

Au cours de cette thèse, nous nous sommes penchés sur trois aspects de la réponse de l'hôte et plus particulièrement sur les deux compartiments essentiels de la physiopathologie du neuropaludisme, l'endothélium et les monocytes. Une cohorte d'enfants béninois présentant soit un paludisme simple soit un neuropaludisme a été constituée dans le cadre du projet NEUROCM (2018-2022) dont l'objectif était d'identifier les facteurs parasitaires et de l'hôte impliqués dans la neuroinflammation et sa résolution au cours du neuropaludisme.

Dans la première partie de cette thèse et en utilisant un modèle de co-culture (Hbec-5i et isolats parasitaires issus des patients de NEUROCM), nous déterminerons si le phénotype clinique des GRi impliqués dans la cytoadhésion à l'endothélium, influence l'activation de l'endothélium. Ensuite, nous déterminerons si la gravité du paludisme impacte le phénotype et la fonctionnalité des monocytes, la répartition des sous-populations monocytaires, leur capacité de phagocytose, et le niveau d'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de phagocytose. Enfin, dans la dernière partie, nous essayerons d'identifier des facteurs de risque de décès par neuropaludisme chez les enfants inclus au travers de dosages de biomarqueurs plasmatiques et urinaires. Le but étant d'améliorer notre compréhension de la pathogenèse du neuropaludisme afin d'orienter la prise en charge du patient vers des traitements plus adaptés.

I- Étude des médiateurs de l'activation de la réponse endothéliale lors d'une infection palustre

1. Introduction

La cytoadhérence des GRi par *P. falciparum* provoque une obstruction microvasculaire, une ischémie et une hypoxie, déclenche une activation et une signalisation endothéliales, une altération de la BHE et une série de réponses immunitaires des cellules hôtes pour résoudre le processus de neuroinflammation. La séquestration parasitaire est donc considérée comme l'étape clé du développement du neuropaludisme. Tous ces processus sont considérés comme interdépendants. Cependant, la guérison du neuropaludisme dépend à la fois de l'élimination du parasite et de la résolution de la neuroinflammation. À l'interface entre la circulation et les tissus environnants, l'endothélium joue un rôle central dans l'homéostasie, notamment la perméabilité de la BHE, la régulation de l'homéostasie thrombotique, la modulation des progéniteurs vasculaires hématopoïétiques et l'orientation des réponses inflammatoires et immunitaires locales à la suite d'une attaque par un pathogène externe. L'activation endothéliale a déjà été décrite lors de l'infection par *P. falciparum* et est définie comme une activation pro-thrombotique exacerbée et des réponses pro-inflammatoires délétères. L'origine de cette activation endothéliale n'est pas bien connue et semble résulter de la réponse immunitaire systémique lors d'un paludisme sévère ou des facteurs de virulence des parasites séquestrés. Bien que la séquestration des GRi soit le phénomène le plus étudié au cours du neuropaludisme, l'interconnexion entre l'adhérence des GRi à l'endothélium cérébral, l'inflammation locale et l'activation endothéliale n'est pas bien définie. Il est donc très important de découvrir les phénomènes exacts impliqués dans la résolution de la neuroinflammation, ce qui pourrait être bénéfique pour la gestion efficace de cette maladie grave.

L'objectif de cette étude est de décrire, dans un modèle de co-culture, l'influence du phénotype de cytoadhérence des isolats cliniques de *P. falciparum* sur la réponse des cellules endothéliales (Hbec-5i) par une analyse transcriptomique et par l'analyse des cytokines produites.

Les résultats de l'étude des médiateurs de l'activation de la réponse endothéliale lors d'une infection palustre sont présentés sous forme d'article en anglais, dont voici le résumé en français :

2. Activation phenotype of the endothelial cell line HBEC-5i following coculture between infected red blood cells by cerebral malaria isolates and endothelial cells

2.1. Résumé

La séquestration des globules rouges infectés par *P. falciparum* (GRi) dans la microvasculature est une caractéristique essentielle de la pathologie du neuropaludisme (CM). L'activation et le dysfonctionnement de l'endothélium cérébral sont à l'interface de la neuroinflammation. Les mécanismes qui sous-tendent l'activation des cellules endothéliales (CEs) par les GRi sont encore mal compris. Dans cette étude, nous avons exploré l'impact du phénotype de cytoadhérence des isolats sur la réponse endothéliale. Dans ce contexte, des enfants béninois atteints de neuropaludisme (CM) et de paludisme simple (UM) ont été recrutés. En cultivant la lignée de cellules endothéliales cérébrales (Hbec-5i) avec des GRi provenant d'enfants atteints de paludisme, nous avons étudié d'une part le niveau d'expression des gènes et d'autre part la production de cytokines/chimiokines, par les CEs après leur interaction directe (contact cellulaire) ou indirecte (sans contact cellulaire) avec les GRi, afin de comparer l'activation des CEs en fonction du type d'isolat clinique (UM ou CM). L'analyse du sécrétome endothélial après l'interaction entre GRi et CEs a révélé une sécrétion similaire de protéines pro-thrombotiques (vW-A2 et SerpinE1), de cytokines pro-inflammatoires (TNFR1 et 2, ostéopontine (OPN), IFN α , gp130, IL-8 et IL-6R), de cytokine anti-inflammatoire (IL-11) et de protéines de l'homéostasie endothéliale (IFN β , angiopoïétine 2 (ANG2), pentraxine 3, ICAM-1, MMP-1/2/3 et VEGFA) quel que soit le type clinique des isolats. L'étude transcriptomique des CEs a révélé que l'expression des gènes *nrf2*, *nf-K β* , *fadd*, *inos*, *ppary* et *vegfa* était augmentée de manière significative après co-incubation en contact cellulaire des CEs avec des GRi provenant de patients souffrant de neuropaludisme. Des analyses complémentaires ont révélé que le niveau de *nrf2* était particulièrement augmenté dans les CEs par l'adhésion d'isolats CM. Nous avons émis l'hypothèse que la cytoadhérence des GRi n'est pas le seul mécanisme pouvant conduire à la stimulation des CEs, induisant la production de diverses cytokines/chimiokines.

2.2. Article I

vianou et al. – En préparation – Dec 2023

Activation phenotype of HBEC-5i cells following co-culture with *P. falciparum*-infected erythrocyte isolates from children with cerebral malaria

Author names and affiliations

B. Vianou^{1,2*}, L. Houzé^{1*}, J. Fraering¹, IM Gomez¹, V. Joste^{1,3,4}, B. Palmier⁵, C. Guerin⁵, E. Guillochon^{1,6}, J.F. Faucher⁷, S. Houzé^{1,3,4}, G. Cottrell¹, A. Aubouy⁸, G.I. Bertin¹, N. Argy^{1,3}¶ and NeuroCM group.

1. Université Paris Cité, MERIT, IRD, Paris, France
2. Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Cotonou, Bénin
3. Parasitology Laboratory, Hôpital Bichat - Claude-Bernard, APHP, Paris, France
4. French Malaria Reference Center, Hôpital Bichat, APHP, Paris, France
5. Université Paris Cité, INSERM UMR_S1140, Innovative Therapies in Haemostasis, Paris, France.
6. Université de Paris, INSERM U1133, CNRS UMR 8251, 75006, Paris, France
7. INSERM, Univ. Limoges, CHU Limoges, IRD, U1094 Tropical Neuroepidemiology, Institute of Epidemiology and Tropical Neurology, GEIST, Limoges, France
8. Université de Toulouse, PHARMADEV, IRD, UPS, Toulouse, France

* B. Vianou and L. Houzé contributed equally

¶ Corresponding author Nicolas Argy, Université Paris Cité, MERIT, IRD, Paris, France.
nicolas.argy@aphp.fr

Running title. Endothelial activation by parasite sequestration

Abstract

P. falciparum infected red blood cells (*Pf*-iRBCs) sequestration in the microvasculature is a hallmark of cerebral malaria (CM) pathology. Brain endothelium activation and dysfunction is at the interface of the neuroinflammation. The mechanisms underlying endothelial cells (ECs) activation by *Pf*-iRBCs are still poorly understood. In this study, we aimed to explore the strict impact of the cytoadherence phenotype of *Pf*-iRBCs isolates on endothelial response. In this context, Beninese children with CM and uncomplicated malaria (UM) were recruited. Culturing human brain endothelium cells (Hbec-5i) with *Pf*-iRBCs from malaria patients, we investigated genes and cytokine/chemokine responses of ECs after their interaction with *Pf*-iRBCs with or without contact, and compared EC activation according to the clinical type of infecting isolate (UM or CM). Endothelial secretome analysis following iRBC-EC interaction resulted in similar secretion of pro-thrombotic proteins (vW-A2 and SerpinE1), pro-inflammatory cytokines (TNFR1 and 2, osteopontin (OPN), IFN α , gp130, IL-8 and IL-6R), anti-inflammatory cytokine (IL-11) and endothelial homeostasis proteins (IFN β , angiopoietin 2 (ANG2), pentraxin 3, ICAM-1, MMP-1/2/3 and VEGFA) between UM and CM isolates. The accompanying transcriptome study of the ECs identified that *nrf2*, *nf-K β* , *fadd*, *inos*, *ppary* and *vegfa* genes were significantly increased in expression after co-incubation with adherent *Pf*-iRBCs from CM patient. Further analyses revealed that *nrf2* transcript level was particularly increased in ECs by CM parasite adhesion. We postulated that the cytoadherence of *Pf*-iRBCs is not the only mechanisms that can lead to stimulation of ECs, inducing the production of various cytokines/chemokines.

Keywords: cerebral malaria, isolates phenotype, cytoadherence, endothelium activation

Introduction

Malaria is a life-threatening intertropical infection still responsible for 608,000 worldwide deaths mainly in African children under 5-years-old (1). Among the *Plasmodium* species, *Plasmodium falciparum* is the most virulent, at the origin of severe malaria cases resulting from visceral damage including the central nervous system. Cerebral malaria (CM) onset is a multifactorial process resulting of cerebral post-capillary venules occlusion, systemic and local inflammation with pro-inflammatory cytokines production leading to leukocytes recruitment and an endothelial activation leading to intracerebral vascular coagulation disorders, blood-brain barrier disruption and brain swelling (2).

P. falciparum-infected red blood cells (iRBC) adhesion on cerebral endothelial cells is a milestone for CM development. This intravascular iRBC sequestration is mediated through *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (*PfEMP*-1). This polymorphic parasite protein, encoded by the multicopy *var* gene family, is composed by a succession of extracellular Duffy Binding Like domain ($DBL\alpha/\beta/\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$) and Cysteine-rich InterDomain Region ($CIDR\alpha/\beta/\gamma/\delta$) subtype possibly organized into sets termed Domain cassettes (DC), which give the iRBC abilities to evade the immune host response and to present multiple cytoadherence phenotypes. Although several endothelial receptors were initially incriminated in severe malaria, Endothelial Protein C Receptor (EPCR) and InterCellular Adhesion Membrane 1 (ICAM-1) seem to be the most involved endothelial receptors during CM through their interaction respectively with $CIDR\alpha 1$ and $DBL\beta 1/3/5$ *PfEMP*-1 domain (3).

At the interface between the circulation and the surrounding tissues, the endothelium is a heterogeneous network playing key roles in angiogenesis, vascular tone, coagulation, barrier permeability, local inflammatory and immune responses orientation following attack by an external pathogen (4,5). Deregulated endothelial activation also participated to the cascade resulting in CM and blood-brain barrier dysfunction but the molecular and cellular events triggering a maladaptive endothelial response are not completely elucidated, suggesting an impact of the iRBC sequestration, secreted parasitic proteins and/or systemic immune response on this phenomenon (6,7). Histopathological investigations as well as *in vitro* models with *P. falciparum* strains highlighted that direct iRBC-endothelium interaction enhanced endothelial apoptosis, pro- and anti-inflammatory responses as well as an endothelial pro-adhesive status revealing a potential dual impact of iRBC cytoadherence on CM pathogenesis (8–12).

However, in front of a high *PfEMP-1* polymorphisms with variable cytoadherence phenotype in clinical *P. falciparum* isolates, influence of iRBC cytoadhesion phenotype on endothelial cells response has not been explored. In this context, the aim of this study was to investigate, in a co-culture *in vitro* model, the impact of the cytoadherence phenotype of *P. falciparum* iRBC from CM and UM clinical isolates on the endothelial response through transcriptomic analysis and secreted endothelial cytokines repertoire exploration.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was part of the NeuroCM project who has received the ethics approval from Comité National d'Éthique pour la Recherche en Santé of Benin (n.67/MS/DC/SGM/DRFMT/CNERS/SA; 10/17/2017) and has also been approved by Comité consultatif de déontologie et d'éthique of Institut de Recherche pour le Développement (IRD;10/24/2017).

Recruitment of study participants

According to previous inclusion criteria (13), children were recruited during a longitudinal study between March and November 2018 in Cotonou, Benin. This study involved a cohort of children aged from two to six years-old presenting with either uncomplicated malaria (UM) or cerebral malaria (CM). UM was defined by fever at inclusion or within 24 h before and *P. falciparum* positive thick or thin blood smear, without clinical or biological signs of severe malaria. CM was defined by a Blantyre score ≤ 2 at diagnosis and a confirmed microscopic presence of *P. falciparum* infection after exclusion of others infectious causes for coma. Parental informed consent was also required for children to participate in the study. Recruitment of CM cases took place at the pediatric department of the Centre Hospitalier et Universitaire-Mère et Enfant de la Lagune (CHU-MEL) in the urban area of Cotonou and at the hospital pediatric department of the semi urban area of Abomey-Calavi (CHU-ZAS). Recruitment of UM cases took place at the Sô-Ava health center in a rural and lake area located in southern Benin at 25 km from Cotonou.

Sample processing

For each included patient, venous blood samples were collected for biological investigations. Malaria diagnosis and parasitaemia estimation were performed on blood smears stained by

Giemsa. Genomic DNA isolates was extracted from 200 μ L of whole blood with the QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen®, Hilden, Germany) and Plasmodium species diagnosis with FTD Malaria differentiation (Fast-Track Diagnostics®, Luxembourg) was performed following the manufacturer’s recommendations to confirmed *P. falciparum* mono-infection. Microbiological coinfections were ruled out through large microbiological investigations included blood and cerebrospinal fluid culture completed by a broad molecular approach using Biofire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel multiplex PCR (Biomérieux®, Marcy-l’Etoile, France). After centrifugation, separated plasma from whole blood was stored at -20°C . Peripheral blood mononuclear cells were removed from the RBC pellet with Ficoll-Paque PLUS Media (GE Healthcare®, Chicago, Illinois, USA). Two hundred microliters of the de leukocyted RBC pellet were conserved in 1 mL of TRIzol LS reagent (Thermofischer®, Carlsbad, California, USA) and stored at -80°C until RNA extraction. The remainder was cultured, when possible, to obtain mature parasite forms for co-culture assays.

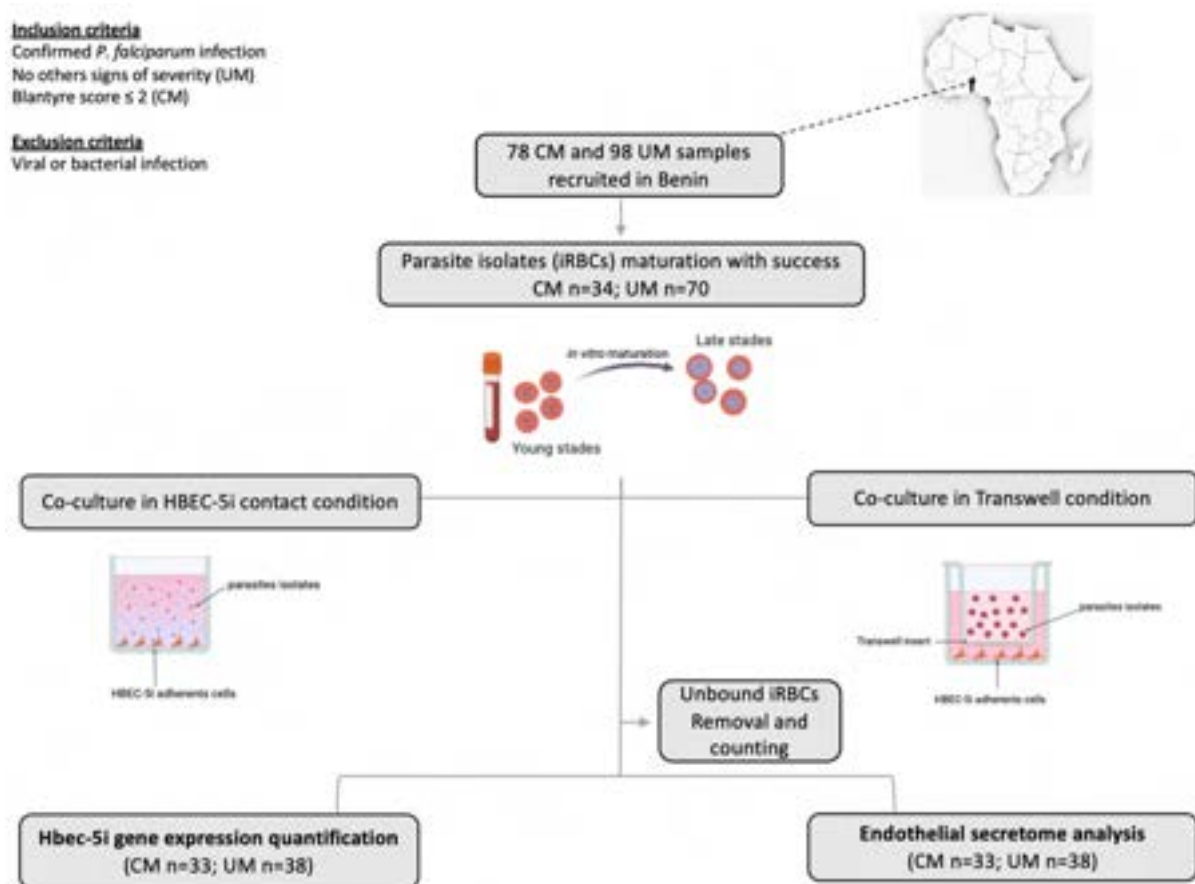


Figure 1: Flowchart of the method used in the study

Isolate maturation

Viable isolates with a parasitemia above 0.5% were included for parasite maturation in culture and reduced to 10% hematocrit in flask containing complete RPMI medium (RPMI 1640 with 0.2 mM hypoxanthin, 0.5 % AlbuMAX II (Thermofischer®), 200M-glutamine (Thermofischer®), 25 mM HEPES (Thermofischer®), 10 g/ml gentamicin (Thermofischer®), and 2% human AB serum male (Biowest®, Nuaille, France). The flasks were then gassed with the nitrogen mixture (N₂ 92.5%, O₂ 2% and 5.5% CO₂) and incubated at 37°C between 18 to 24 hours until parasites mature forms (late trophozoites and schizonts) are predominant (> 50%). Late stages were enriched using MACS magnetic columns (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Germany) for co-culture assay.

Human Brain Endothelial Cell Line (Hbec-5i) culture

Co-culture model was carried out using Human brain endothelial cells (Hbec-5i) purchased from American Type Culture Collection (ATCC CRL-3245, USA). Hbec-5i were cultured in 0.1% gelatin-coated flasks for up to ten passages with Dulbecco Modified Eagles Minimal medium (DMEM) (Thermofischer®) supplemented with 1% fetal calf serum (Thermofischer®), 200 M L-glutamine (Thermofischer®), 1% penicillin-Streptomycin (Thermofischer®) and 1X MGVS (Thermofischer®) at 37°C in an atmosphere 95% O₂/5% CO₂. Trypsinization and cells count were performed when the cells were at confluence (> 80%). Hbec-5i characterization was performed by measuring ICAM-1 and EPCR transcript and protein expression by reverse-transcriptase PCR and western-blot, respectively (**Supplemental figure S1**).

Co-culture model

For the present study, we used clinical isolates from CM patients that have successfully matured (n = 33). To avoid day-to-day experimental variation, UM samples (n = 38) were adjusted with the CM samples run in the same-day assay. Hbec-5i cells were seeded onto 0.1% gelatin-coated 24-well plate (Dutscher®, Issy-Les-Moulineaux, France) for 8 to 24 hours to grow until confluence (> 80%). Enriched *P. falciparum* late stages were resuspended in prewarmed binding medium (DMEM supplemented with 1% fetal calf serum, 200 M L-glutamine, 1% penicillin-Streptomycin and 1X MGVS) at 20% parasitaemia (10⁷ cells/mL). One milliliter of the parasite suspension was added to each well containing confluent monolayer Hbec-5i and incubated for 60 min at 37°C 5% CO₂. Unbound erythrocytes were washed off gently with the binding medium and counted on KovaSlide® to estimate adhering iRBC in each well. One milliliter of binding medium was then added into each well and incubated for another 6 hours.

Supernatants were collected and stored at -80°C for endothelial biomarkers assays. Confluent monolayer cells were conserved in 500 µL TRIzol and stored at -80 °C until RNA extraction. In the same experimental condition, co-culture model with a transwell device with a porosity at 5 µm (Corning®, Corning, New York, USA) was also performed. For each *P. falciparum* isolate, assays were performed in duplicate. Confluent monolayer Hbec-5i alone and confluent monolayer Hbec-5i cells co-incubated with uninfected RBC (uRBC) were used as a negative control in each condition.

RNA extraction and cDNA synthesis

Using TRIzol® prepared from iRBC pellet and from monolayer Hbec-5i after co-culture, RNA was isolated by chloroform extraction and isopropanol precipitation. RNAs were treated with DNase I (Invitrogen®, Waltham, Massachusetts, USA) and purified using the RNeasy minikit (Qiagen®) following the manufacturer's recommendations. Absence of remaining genomic DNA was tested by RT-PCR targeting the Hbec-5i β-actine gene and the *P. falciparum* seryl-tRNA synthetase (P90) gene. Reverse transcription of RNAs was performed with OligodT by SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen®) following manufacturer's recommendations.

Transcripts level determination by RT-qPCR

Each RT-qPCR was carried out on Rotorgene thermal cycler with SensiFAST™ SYBR No-ROX master mix (Meridian Bioscience®, Cincinnati, Ohio, USA) with 400 nM of specific primers set and 1 µL cDNA. *var* gene expression quantification was carried out based on previous publication and *var* gene transcript level was calculated using the relative standard curve method with several plasmid dilutions (GenScript®, Piscataway, New Jersey, USA). Quantified *var* gene domains levels were normalized with the seryl-tRNA synthetase (P90) transcript expression (14). *P. falciparum* and Human gDNA were used as positive and negative control respectively in each qPCR. Hbec-5i transcripts levels from 14 genes (*casp3*, *casp9*, *cx3cl1*, *cxcl9*, *ang1*, *bcl2*, *bax*, *nrf2*, *nf-Kβ*, *fadd*, *hif-1a*, *inos*, *ppary*, *vegfa*) were evaluated (**supplemental Table S1**). Primer's efficiencies were calculated using 4-dilution range. PCR conditions were: 95 ° C for 2 minutes, then 40 cycles (95 ° C for 5 seconds, 60 ° C for 10 seconds, 72 ° C for 10 seconds) followed by a dissociation step from 65 ° C to 95 ° C. Hbec-5i gDNA and water were respectively used as positive and negative control in each qPCR run. Data were analyzed by the Rotorgene software for which the threshold cycle was set at 0.03. The specificity of each PCR product was verified by the specific melting curve for each pair of primers. Relative expression of Hbec-5i transcripts were determined using the Pfaffl formula

considering co-culture without iRBC as normal condition (i.e. mean transcript level of confluent monolayer Hbec-5i alone and confluent monolayer Hbec-5i co-incubated with uRBC) and β -actine as housekeeping gene (15).

Supplemental Table S1: Forward and reverse gene primers sequences used for Hbec-5i transcripts levels determination

Genes	Primers efficiency	Forward primer sequence (5'->3')	Reverse primer sequence (5'->3')
<i>ang1</i>	1.84	TTAACAGGAGGATGGTGGTTT	GGTTTTGTCCCGCAGTATAGA
<i>bax</i>	2.14	CCTGTGCACCAAGGTGCCGGA	CCACCCTGGTCTTGGATCCAGCCC
<i>bcl2</i>	1.79	TTGCTTTACGTGGCCTGTTTC	GAAGACCCTGAAGGACAGCCAT
<i>casp3</i>	2.2	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG	GCATCGACATCTGTACCAGACC
<i>casp9</i>	1.75	GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT	CAACGTACCAGGAGCCACTCTT
<i>cxcl9</i>	2.19	CTGTTCTGCATCAGCACCAAC	TGAACTCCATTCTTCAGGTAGCA
<i>cx3cl1</i>	2.61	CACCTTCTGCCATCTGACTGT	GCATGATGCCTGGTTCTGTTG
<i>fadd</i>	2.26	GCTGGCTCGTCAGCTCAAA	ACTGTTGCGTTCTCCTTCTCT
<i>hif-1a</i>	2.87	TATGAGCCAGAAGAACTTTTAGGC	CACCTCTTTTGGCAAGCATCCTG
<i>nf-Kβ</i>	2.21	GCAGCACTACTTCTTGACCACC	TCTGCTCCTGAGCATTGACGTC
<i>nos1</i>	2.83	GCTCTACACCTCCAATGTGACC	CTGCCGAGATTTGAGCCTCATG
<i>nrf2</i>	2.78	CACATCCAGTCAGAAACCAGTGG	GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
<i>pparγ</i>	2	AGCCTGCGAAAGCCTTTTGGTG	GGCTTCACATTCAGCAAACCTGG
<i>vegfa</i>	2	CTACCTCCACCATGCCAAGT	CCACTTCGTGATGATTCTGC
<i>β-actine</i>	2.09	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC

Primers sequences were obtained on the Origene website and ordered from IDT, France

Endothelial secretome analysis

Hbec-5i secretome in the co-culture supernatant was investigated using the Human Premixed Multi-Analyte Kit (R&D Systems-Bio Techne®, Minneapolis, Minnesota, USA). The panels chosen targeted pro-thrombotic proteins (von Willebrand antigen (vW-A2) and Serpine 1 (SerpineE1)), pro-inflammatory biomarkers (soluble TNF- α receptor (TNF-R1 and 2), osteopontin (OPN), Interferon alpha (IFN α), glycoprotein 130 (gp130), Interleukin 8 (IL-8), soluble IL-6 receptor (IL-6R) and anti-inflammatory cytokine (Interleukin 11 (IL-11)) and endothelial homeostasis proteins (Interferon beta (IFN β), angiopoietin 2 (ANG2), pentraxin 3 (PTX3), InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Matrix Metalloproteases 1, 2 and 3 (MMP-1/2/3) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFA)).

After rapid thawing of the co-culture supernatants at 37 ° C, samples were processed in duplicate following the manufacturer's recommendations. Each sample (50 µL) was incubated 2 hours at room temperature on a shaker at 800 ± 50 spins/min with the microparticles. After 3 times washing, 50 µL of biotinylated antibody was added per well followed by 1-hour incubation at room temperature on a shaker (at 800 ± 50 spins/min). Plate was washed again times and 50 µL of Streptavidin PE was added to each well and then homogenized by backflow aspiration. Finally, 100 µL of washing buffer was added and the plate was incubated for 2 minutes on the shaker (at 800 ± 50 spins/min) and then read by the LUMINEX® 100/200 instrument within 90 minutes after the end of the last incubation. Quantification of secreted biomarkers was performed using a cascade dilution of reconstituted standard cocktails of each analytes selected. Basal cells secretion was estimated as the mean of the detected biomarkers concentration in supernatants obtain from uRBC and cells co-culture and cells culture alone, with or without transwell. Diluent was also used as negative control. Normalization by basal cells secretion was applied on each sample for each analyte by subtracting sample concentration and basal cells secretion.

Statistical analysis

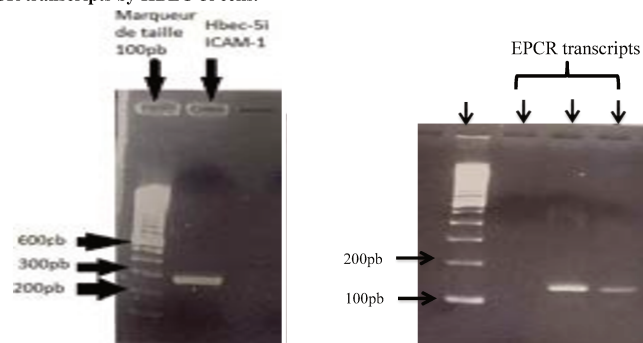
Statistical analyses were performed by comparing UM and CM data according to experimental conditions. Quantitative variables were described by their median and interquartile range (IQR) and frequency by n (%). Pearson's Chi-squared test was used to compare proportions. A Wilcoxon-Mann-Whitney test was performed to compare variables between UM and CM isolates and a Wilcoxon paired test was performed to compare variables in each clinical group according to experimental conditions. Correlation coefficients between variables were evaluated using the Spearman test. $P \leq 0.05$ was considered significant.

Results

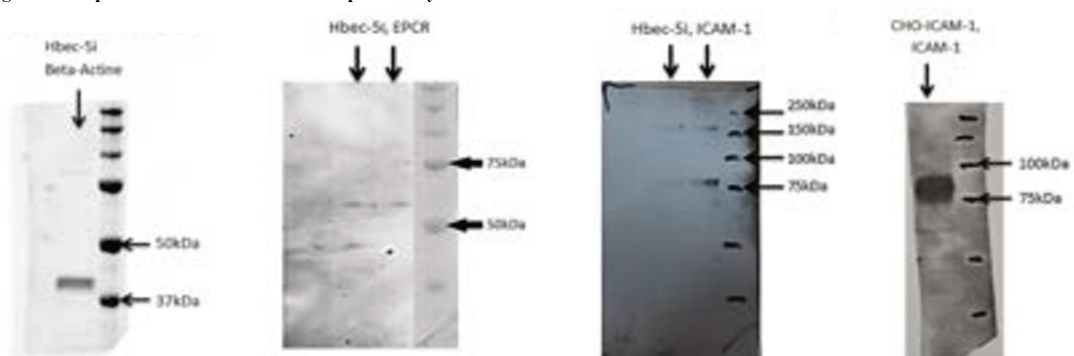
Study population.

Seventy-one isolates were enrolled for this *in vitro* co-culture study on the 171 initially included samples from NeuroCM cohort, corresponding to 33 CM and 38 UM cases. Among the CM group, patients were significantly younger compared to UM group (42.1 (36.1 - 48.3) vs. 59.9 (47.7 - 66.1) months; $p < 0.001$) and presented a high frequency of hepatomegaly (57.6 vs. 13.5 %; $p < 0.001$), a higher leukocytes counts (14.2 vs. 7.2 G/L; $p < 0.001$) and a deeper thrombocytopenia (81 vs. 174 G/L; $p < 0.001$) associated to multiple biological severe criteria as a severe anemia (5.4 vs. 9.8 g/dl; $p < 0.001$), a hyperparasitaemia (243.700 vs. 76.195 parasites/ μ L; $p < 0.001$) and a hyperbilirubinemia (21 vs. 11.5 mg/L; $p < 0.001$). Malarial retinopathy was observed in 67% of CM cases. Twelve CM patients died (36.4%) in spite of adequate management including parenteral treatment with artesunate (**Table 1**).

Supplemental figure 1a: Expression of ICAM-1 and EPCR transcripts by HBEC-5i cells.



Supplemental figure 1b: Expression of ICAM-1 and EPCR proteins by HBEC-5i cells.



Supplemental figure S1: ICAM-1 and EPCR transcripts and proteins expression by Hbec-5i cells

Table 1: Clinical and biological characteristics of included patients selected for co-culture model

	CM (n=33)	UM (n=38)	Total (n=71)	P-value ^a
Age, months (IQR)	42.1 (36.1- 48.3)	59.9 (47.7 - 66.1)	48 (38.6 - 60.1)	< 0.001
Gender (% female)	17/33 (51.5)	13/38 (34.2)	30/71 (42.3)	0.14
Fever (°C)	38.5 (37.5 - 39.3)	37.8 (37.2 - 39.8)	38 (37.3 - 39.2)	0.2
Splenomegaly (%)	11/33 (33.3)	6/37 (16.2)	17/70 (24.3)	0.1
Hepatomegaly (%)	19/33 (57.6)	5/37 (13.5)	24/70 (34.3)	< 0.001
Repeated seizures (%)	13/33 (39.4)	0/38 (0)	13/71 (18.3)	< 0.001
Headache (%)	5/33 (15.2)	1/38 (2.6)	6/71 (8.5)	0.09
Jaundice (%)	14/33 (42.4)	0/38 (0)	14 (19.7)	< 0.001
Hemorrhagic syndrome (%)	3/33 (9.1)	0/38 (0)	3/71 (4.2)	0.1
Mortality (%)	12/33 (36.4)	0/38 (0)	12/71 (16.9)	< 0.001
Parasitaemia (parasites/ μ l)	243.700 (61.475 - 605.260)	76.195 (23.340 - 220.980)	119.130 (39.500 - 299.200)	0.002
Haemoglobin (g/dl)	5.4 (4.3 - 6.5)	9.8 (8.6 - 10.8)	8.2 (5.6 - 10.1)	< 0.001
Leukocytes (G/L)	14.2 (10.5 - 22.4)	7.2 (5.7 - 7.9)	8.8 (6.9 - 14.1)	< 0.001
Neutrophils (G/L)	9.1 (5.6 - 14.8)	3.9 (2.4 - 4.7)	5.1 (3.7 - 9.3)	< 0.001
Lymphocytes (G/L)	4.8 (3.2 - 7.8)	2.1 (1.6 - 2.5)	2.6 (1.8 - 4.5)	< 0.001
Monocytes (G/L)	1 (0.6 - 1.5)	0.9 (0.5 - 1.0)	0.9 (0.5 - 1.2)	0.08
Platelets (G/L)	81 (54.5 - 114.3)	174 (98 - 232)	114 (81 - 180)	< 0.001
Creatinine (mg/L)	4 (3 - 6)	3.1 (3 - 3.7)	3.2 (3 - 4.4)	0.037
Blood glucose (g/L)	0.7 (0.2 - 1.1)	1 (0.9 - 1.2)	0.95 (0.7 - 1.1)	< 0.001
Total bilirubin (mg/L)	21 (13.2 - 43.1)	11.5 (7.8 - 18.2)	14.8 (9.3 - 25.2)	< 0.001
Lactate (mmol/L)	8.4 (4.3 - 9.9)	NA	NA	NA

Quantitative variables were represented by median (1st quartile – 3rd quartile) and categorical variables were represented as n/n (%). ^a Pearson's Chi-squared test was used to compare proportions. Mann-Whitney U test was used for the statistical comparison of the non-parametric variables. Significant values $p < 0.05$ are indicated in bold, CM = Cerebral malaria; UM = uncomplicated malaria; NA = not applicable.

***Var* transcripts expression level and binding phenotype of clinical isolates**

iRBC adhesion to the Hbec-5i cells surface for clinical isolates from CM patients (n=32) was significantly higher than iRBC adhesion for clinical isolates from UM patients (n=38) (4828 iRBCs/well [3387; 5868] vs. 3957iRBCs/well [2213; 5332] respectively; $P=0.0422$). The EPCR-binding domains DC13 ($p < 0.0001$), CIDR α 1.4 ($p = 0.0024$), CIDR α 1.6 ($p = 0.0065$) and CIDR α 1.7 ($p = 0.049$), the ICAM-1-binding domain DC4 ($p = 0.0004$), DBL β 5 ($p = 0.006$), the double EPCR-ICAM-1-binding domains CIDR α 1.7-DBL β 1/3 ($p < 0.0001$) as well as the

domains without predicted binding characteristics DBL ξ 3 ($p = 0.003$), DBL γ 1 ($p = 0.017$) and DBL α 2/1.1/2/4/7 domains ($p = 0.012$) were significantly upregulated in CM isolates compared to UM isolates. However, no difference was observed for CD36-binding domains (CIDR α 2.3/5/6/7/9/10), EPCR-binding domains (CIDR α 1.1, CIDR α 1.5, CIDR α 1.8), ICAM-1-binding DBL β 1/3 domain and the domains without predicted binding characteristics CIDR α 1.2, DBL ϵ 2 and CIDR δ (**Table 2**).

Relative expression level of Endothelial cell transcripts

nrf2, *nf-K β* , *fadd*, *inos*, *ppary* and *vegfa* relative expression levels in Hbec-5i strain cells were significantly higher after co-incubation with cytoadherent clinical isolates from CM clinical group as compared to cytoadherent isolates from UM clinical group (**Figure 2 A-F and supplemental Table S2**). Higher relative expression of *vegfa* and *inos* was abolished between clinical groups in the Transwell model but were conserved for *nrf2*, *nf-K β* , *fadd* and *ppary* for the clinical isolates from CM clinical group as compared to the isolates from UM clinical group (**Figure 3 A-F**). However, this variation was lower for *nrf2* and *ppary* in this Transwell model as compared to the cytoadherence model. Relative expression of *nf-K β* and *inos* was not significantly different between these two-co-culture model for the clinical isolates from CM group (**Figure 4 A-F**).

Table 2: Relative quantification of *var* gene expression levels of clinical *P. falciparum* isolates from CM and UM included patients for co-culture model

Domains	Group	Predicted receptor	CM		UM		P-value ^a
			n	Median (25th–75th percentile)	n	Median (25th–75th percentile)	
CIDR α 1.1	B/A	EPCR	31	0.06 (0.01 - 0.5)	36	0.01 (0 - 0.13)	0.06
CIDR α 1.2			32	0.005 (0.00002 - 0.01)	35	0.003 (0.01 - 0.007)	0.6
CIDR α 1.4	A	EPCR	32	0.3 (0.03 - 1.19)	36	0.04 (0 - 0.23)	0.002
CIDR α 1.5	A	EPCR	32	0.001 (0.0002 - 0.01)	36	0.0006 (0.0001 - 0.002)	0.12
CIDR α 1.6	A	EPCR	31	0.02 (0.001 - 0.06)	36	0.004 (0.0002 - 0.01)	0.007
CIDR α 1.7	A	EPCR	32	0.003 (0.0005 - 0.01)	33	0.001 (0.0002 - 0.003)	0.05
CIDR α 1.8	B/A	EPCR	32	0.004 (0.0004 - 0.01)	35	0 (0 - 0.009)	0.06
CIDR δ	A		32	0.01 (0.0005 - 0.13)	36	0.01 (0.0006 - 0.07)	0.84
DBL α 2/1.1/2/4/7			32	0.37 (0.19 - 0.9)	36	0.15 (0.07 - 0.44)	0.012
DBL α 1.7	A		31	0.35 (0.02 - 3.1)	34	0.12 (0.01 - 1.21)	0.40
DBL β 1/3-motif	A	ICAM-1	32	0.001 (0 - 0.02)	35	0 (0 - 0.008)	0.27
DBL β 5	B	ICAM-1	32	0.03 (0.006 - 0.08)	36	0.007 (0.001 - 0.02)	0.006
DBL ϵ 2			32	0.0003 (0 - 0.001)	36	0 (0 - 0.001)	0.13
DBL ξ 3			32	0.003 (0.001 - 0.008)	36	0.0004 (0 - 0.003)	0.003
DBL γ 1			32	0.001 (0.0006 - 0.004)	35	0.0005 (0.0002 - 0.002)	0.017
CIDR α 1.7-DBL β 1/3	A	EPCR \pm ICAM-1	32	0.07 (0.009 - 0.23)	34	0.003 (0.0004 - 0.02)	<0.0001
DC4		ICAM-1	32	0.02 (0.005 - 0.09)	36	0.003 (0.0004 - 0.01)	0.0004
DC13		EPCR	32	0.04 (0.01 - 0.1)	33	0.005 (0.001 - 0.02)	<0.0001
CD36		CD36	32	0.0007 (0.0001 - 0.002)	35	0.0003 (0.00006 - 0.001)	0.20

Quantitative variables were represented by median (1st quartile – 3rd quartile)

a Mann-Whitney U test was used for the statistical comparison of the non-parametric variables. Significant values $p < 0.05$ are in bold. CM = Cerebral malaria; UM = uncomplicated malaria.

Supplemental Table S2: Transcripts expression of Hbec-5i cells in presence of adherent parasites from CM and UM clinical groups or in a transwell model

Genes	Cytoadherent pRBC			Transwell model		
	CM group	UM group	P-value	CM group	UM group	P-value
	Median (25%-75% percentile)	Median (25%-75% percentile)		Median (25%-75% percentile)	Median (25%-75% percentile)	
<i>casp3</i>	2.44 (1.68 - 2.80)	1.56 (0.68 - 4.86)	0.4	2.14 (1.58 - 3.40)	3.62 (1.28 - 5.69)	0.12
<i>casp9</i>	0.43 (0.21 - 0.79)	0.31 (0.17 - 0.76)	0.5	0.77 (0.37 - 3.02)	0.43 (0.23 - 1.12)	0.07
<i>cx3cl1</i>	0.001 (0.0001 - 0.03)	0.004 (0.0002 - 0.04)	0.6	0.007 (0.0006 - 0.21)	0.01 (0.001 - 2.13)	0.4
<i>cxcl9</i>	0.07 (0.01 - 0.25)	0.02 (0.004 - 0.34)	0.3	0.07 (0.008 - 0.77)	0.1 (0.007 - 0.65)	0.96
<i>ang1</i>	0.62 (0.03 - 2.14)	0.35 (0.05 - 1.81)	0.6	0.79 (0.24 - 3.65)	1.39 (0.36 - 2.47)	0.76
<i>bcl2</i>	0.37 (0.05 - 1.94)	0.46 (0.03 - 5.11)	0.4	1.04 (0.02 - 3.15)	0.36 (0.04 - 2.46)	0.67
<i>bax</i>	0.53 (0.29 - 0.76)	0.31 (0.16 - 1.05)	0.1	0.56 (1.17 - 1.51)	0.32 (0.14 - 0.1)	0.3
<i>nrf2</i>	0.33 (0.17 - 0.57)	0.19 (0.13 - 0.29)	0.02*	0.19 (0.12 - 0.33)	0.13 (0.06 - 0.19)	0.031*
<i>nf-Kβ</i>	8.73 (3.29 - 23.72)	1.76 (0.69 - 4.96)	< 0.0002*	11.31 (4.33 - 27.13)	1.88 (0.92 - 3.66)	<0.0001*
<i>fadd</i>	0.67 (0.30 - 0.94)	0.34 (0.17 - 0.51)	0.008*	0.73 (0.47 - 1.49)	0.47 (0.34 - 0.77)	0.024*
<i>hif-1a</i>	30.45 (7.36 - 60.68)	21.88 (3.46 - 38.64)	0.4	10.27 (4.94 - 21.38)	9.75 (4.4 - 34)	0.84
<i>inos</i>	0.51 (0.04 - 531.3)	0.04 (0.006 - 1.25)	0.007*	0.31 (0.03 - 318.1)	0.21 (0.009 - 82.62)	0.13
<i>pparγ</i>	1.18 (0.42 - 1.88)	0.31 (0.13 - 0.69)	< 0.0002*	0.60 (0.22 - 2.1)	0.28 (0.16 - 0.53)	0.019*
<i>vegfa</i>	9.32 (1.42 - 16.78)	2.34 (0.006 - 17.31)	0.039*	19.49 (0.28 - 2121)	17.43 (0.03 - 87.86)	0.22

* Significant values $p < 0.05$ are in bold

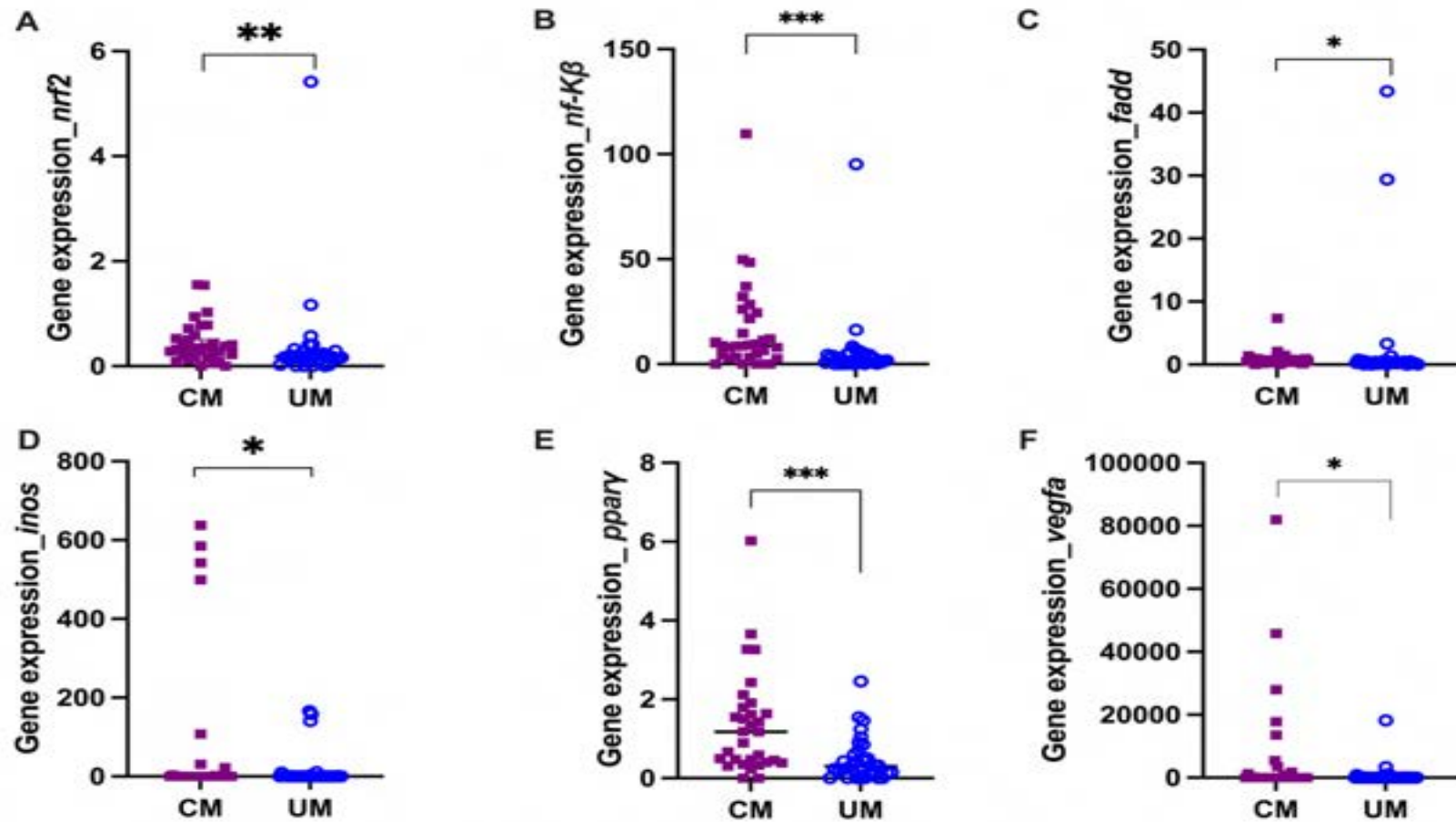


Figure 2: *nrf2* (A), *nf-Kβ* (B), *fadd* (C), *inos* (D), *ppary* (E) and *vegfa* (F) transcripts expression level on endothelial cells are increased in the presence of CM adherent parasites. Hbec-5i transcripts levels were evaluated after co-culture in cytoadhesion condition with *P. falciparum* iRBCs isolates from CM or UM patients. Mann Whitney U test was used to compare CM samples to UM samples. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05. CM = cerebral malaria; UM = uncomplicated malaria.

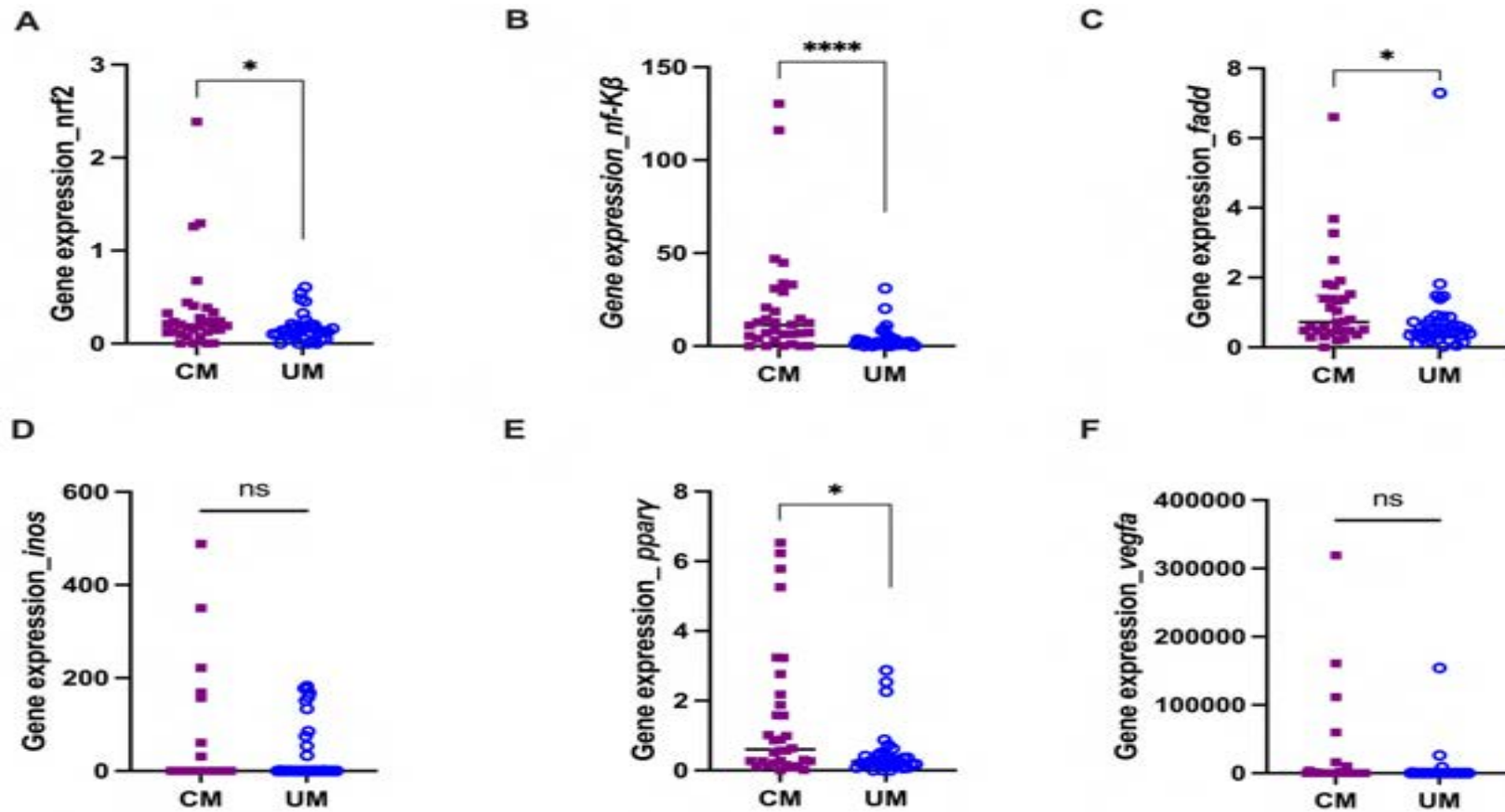


Figure 3: Expression level of endothelial cells transcripts in the transwell model. *nrf2* (A), *nf-Kβ* (B), *fadd* (C), *inos* (D), *ppary* (E) and *vegfa* (F) transcripts expression level on endothelial cells were evaluated after co-culture in a transwell model with *P. falciparum* iRBCs isolates from CM or UM patient. Mann Whitney U test was used to compare CM samples to UM samples. ****P<0.001, *P<0.05. CM = cerebral malaria; UM = uncomplicated malaria.

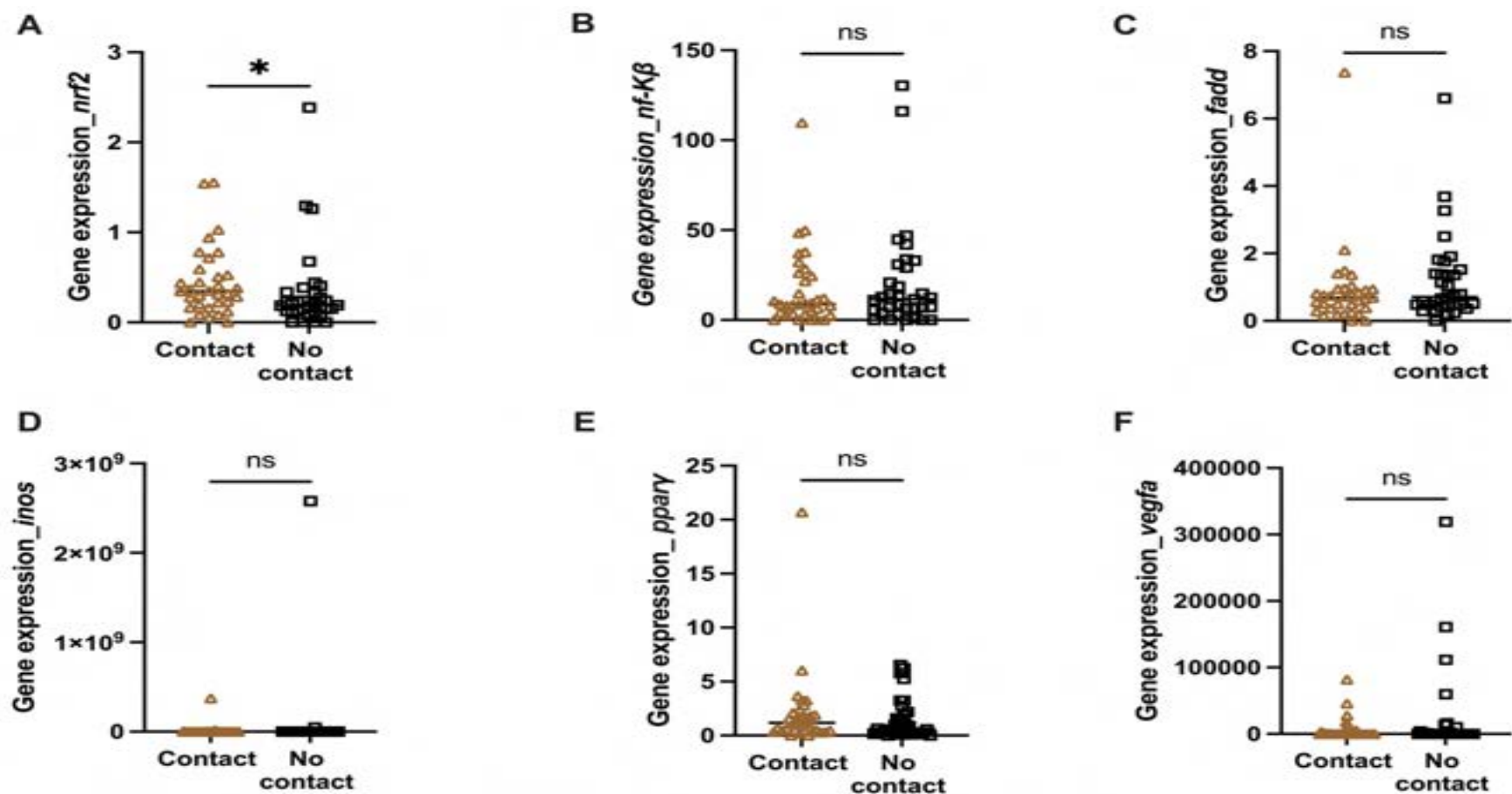


Figure 4: Comparison of Hbec-5i cell transcript expression levels between adherent parasites and the transwell model in CM group. *nrf2* (A), *nf-Kβ* (B), *fadd* (C), *inos* (D), *pparγ* (E) and *vegfa* (F) transcripts expression level on endothelial cells were compared in CM samples between cytoadhesion condition or not. T1: Co-culture model with adherent *P. falciparum* iRBCs from cerebral malaria, T2: Co-culture model in non-adherent *P. falciparum* iRBCs from CM condition

Hbec-5i protein secretome in co-culture supernatants

In this co-culture model, for each target, no difference was observed in the protein concentration measured in the supernatant between clinical group and experimental condition (**Supplemental Table S3**).

Supplemental Table S3: Proteins concentrations secreted by Hbec-5i cells in presence of adherent parasites from CM and UM clinical groups or in a transwell model

Proteins	Cytoadherent iRBCs			Transwell model		
	CM group Median in pg/mL (25%-75% percentile)	UM group Median in pg/mL (25%-75% percentile)	P-value	CM group Median in pg/mL (25%-75% percentile)	UM group Median in pg/mL (25%-75% percentile)	P-value
vWA2	115.5 (87.59 – 130.9)	111 (90.86 – 128.5)	0.94	5.24 (0 – 20.64)	0.89 (0 – 18.2)	0.61
SERP 1	12813 (12361 – 15040)	13060 (12220 – 15339)	0.69	0 (0 – 357.8)	0 (0 – 656.1)	0.56
TNF RI	91.43 (62.42 – 114.8)	93.16 (75.58 – 107.1)	0.67	0 (0 – 10.34)	0 (0 – 2.69)	0.78
TNF RII	12.54 (10.08 – 18.68)	13.42 (11.22 – 18.12)	0.68	0 (0 – 3.97)	0 (0 – 3.42)	0.84
OPN	6675 (5087 – 8165)	6373 (5108 – 8504)	0.75	0 (0 – 789.4)	0 (0 – 1128)	0.52
IFN α	0.26 (0.26 - 0.94)	0.27 (0.26 – 1.11)	0.75	0 (0 – 0.21)	0 (0 – 0.38)	0.44
GP130	17.17 (14.78 – 124.4)	49.41 (14.78 – 135.5)	0.59	0 (0 – 29.55)	0 (0 – 40.71)	0.44
IL8	545.2 (314.2 - 958.9)	590.7 (450.3 - 1083)	0.47	0 (0 – 403.1)	34.89 (0 - 527.6)	0.72
IL6 RA	2.24 (2.24 – 6.4)	2.24 (2.24 – 6.8)	0.81	0 (0 – 0.92)	0 (0 – 1.31)	0.70
IL11	143.9 (14.57 – 317.8)	63.24 (14.57 – 331.6)	0.77	4.45 (0 – 120)	0 (0 – 133.8)	0.63
IFN β	3.1 (3.1 – 4.98)	3.1 (3.1 – 5.59)	0.85	0 (0 – 0.7)	0 (0 – 1.31)	0.95
ANG2	403.7 (296.3 – 815.1)	397.6 (335.6 – 841.1)	0.4	0 (0 – 97.1)	0 (0 – 123)	0.63
PTX-3	492.4 (226.4 – 1014)	481.6 (235 – 912)	0.79	0 (0 – 336.6)	0 (0 – 235.1)	0.48
MMP2	77.24 (77.24 – 474.4)	77.24 (77.24 – 372.1)	0.8	0 (0 – 287.2)	0 (0 – 184.9)	0.48
MMP3	10.16 (1.16 – 24.08)	11.47 (1.16 – 23.66)	0.95	0 (0 - 9.93)	0 (0 – 9.51)	0.81

MMP: Matrix metalloprotease; GP: GlycoProtein; OPN: Osteopontin; PTX: Pentraxin; ANG2: Angiopoietin 2; SERP: Serpine; IFN: Interferon; TNF RI: Tumor Necrosis Factor Receptor 1; TNF RII: Tumor Necrosis Factor Receptor 2; IL6 RA: Interleukine 6 Receptor

Discussion

CM is still a misunderstanding phenomenon for which a “hemodynamic”, “inflammation”, “coagulation disorders” or “innate immunity response” hypothesis were suspected resulting of combined pathophysiological mechanisms as iRBC sequestration, local and/or systemic inflammation and cerebral endothelial activation (5,16). However, the relationship between these events on CM onset are not well known. The objective of the setting up of an *in vitro* co-culture model between clinical *P. falciparum* isolates from CM and UM groups and the human brain endothelium strain Hbec-5i was to explore the impact of the cytoadherence phenotype on the endothelial response.

To look more directly at the role of iRBCs sequestration in CM pathophysiology, we assessed whether parasite isolates from confirmed clinical cases of CM activate ECs differently than do those from UM controls. One interesting finding of this study is that using Hbec-5i cell line, Pf-iRBCs isolated from CM patients had higher binding capacities than those from UM patients. Our results are in agreement with those previously reported, which showed preferential cytoadhesion of Pf-iRBCs from CM patient to endothelial cells line (17,14), suggesting that it is an intrinsic property of the parasite phenotype. Note that Hbec-5i cells used in this study have been described as expressing high levels of membrane receptors such as EPCR, ICAM-1, and PECAM (18,19), receptors involved in cytoadherence in brain (20–22). This binding property observed for Pf-iRBCs from CM patient may lead to preferential sequestration in microvasculature since ECs are reported to express ICAM1 and EPCR (23).

We then examined whether the cytoadherence phenotype is determined by the expression of specific PfEMP1 variants by performing *var* gene analysis by qPCR. Our results showed that EPCR-binding CIDR α 1 subclasses (CIDR α 1.4, CIDR α 1.6, CIDR α 1.7) were highly expressed in CM isolates in accordance with the literature. Endothelial protein C receptor (EPCR), a host receptor involved in anticoagulation and endothelial protection, has already been identified as a receptor of PfEMP1 (22). It has been previously observed that EPCR plays an important role in severe malaria pathogenesis as preferred binding between EPCR and CIDR α 1. To avoid splenic destruction, PfEMP1 CIDR α 1 domain adheres to EPCR (24). High levels of transcripts encoding EPCR-binding PfEMP1 were found in patients with symptomatic infections, and the abundance of these transcripts increased with disease severity (20). In line with previously reported observations (20), CD36-binding domains (CIDR α 2.3/5/6/7/9/10) expression in CM isolates was not statistically significant compared to UM isolates. CD36 has rarely been described as a factor promoting CM. We also observed that the *var* transcript ICAM-1-binding domain (DBL β 5) and double domains CIDR α 1.7-DBL β 1/3 levels in children were associated

with CM. These results suggest that EPCR and ICAM-1 binding domains overexpressed in clinical *P. falciparum* isolates from CM group promoted cytoadhesion on Hbec-5i.

To decipher the mechanisms implicated in ECs activation, the effect of the parasite cytoadherence on ECs transcriptome was explored. We demonstrate differential expression of ECs *nrf2*, *nf-K β* , *fadd*, *ppar γ* , *inos* and *vegfa* transcripts between Hbec-5i co-cultured with iRBCs from CM and iRBCs from UM, with increased expression when iRBCs from CM are in contact with Hbec-5i cells. Gene expression level of the *nrf2* transcript was increased by parasite adhesion while cells contact didn't influence *nf-K β* , *fadd* and *ppar γ* expression.

Antioxidant and anti-inflammatory proteins are regulated by the transcription factor *nrf2* transcript in response to oxidative stress such as infection, hemolysis, or neurodegeneration (25). In mice model, *nrf2* protects from ECM via induction of HO-1, an enzyme that catabolizes heme (26). Other studies have shown that the activation of *nrf2* is the result of excessive ROS production following cerebral ischemia (27) and that this activation constitutes a key mechanism in the antioxidant defense used by host cells during infection (28). CM occurrence would therefore be associated with an inhibition of the capacity of monocytes to produce an oxidative response, due to *nrf2* activation by the vascular endothelium. We have also shown that the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*ppar γ*) was up-regulated in presence of adherent or non-adherent Pf-iRBCs from CM. *ppar γ* is a nuclear receptor well known for its role in the activation of anti-inflammatory genes. It has been demonstrated that PPAR- γ activity is regulated by TNF- α , a key molecule involved in cerebral malaria development (29). PPAR γ has also been shown to have a protective function against infections by modulating the immune response and reducing inflammation. PPAR- γ heterodimerizes with the 9-cis-retinoic acid nuclear receptor retinoid X receptors (RXRs) upon translocation to the cell nucleus to regulate gene expression (30). By acting as direct or indirect exogenous ligands for PPAR- γ , *Plasmodium* can trigger the translocation of the latter from the cytoplasm to the nucleus, where it suppresses the expression of genes involved in the production of proinflammatory cytokines (31). However, other researchers have hypothesized that activation of PPAR γ may impair the function of immune cells, such as macrophages and ECs, and contribute to the development of infections.

nf-K β transcript levels were higher on Hbec-5i co-cultured with iRBCs from CM when compared to iRBCs from UM, with or without contact between ECs and RBCs. This result

shows that cell contact doesn't influence *nf-K β* expression by ECs. *nf-K β* is the main transcription factor of the inflammatory response and crucial in maintaining a balance between suppression, effective response, and immunopathologies (24). Exposure to *Pf*-iRBCs has been shown to induce *nf-K β* expression in human brain microvascular endothelial cells *in vitro* (25) and NF-kappaB pathway was reported central to the regulation of the *P. falciparum*-modulated endothelium transcriptome (26). Immunohistochemistry in post-mortem brain tissues of patients who died from CM documented that *nf-K β* is one of the signaling factors that modulates apoptosis in the brain ECs (11). In the same way as *nf-K β* , the pro-apoptotic gene *fadd* was upregulated by Hbec-5i co-cultured with iRBCs from CM when compared to iRBCs from UM, and this with or without contact between ECs and RBCs. As before, this result suggests that parasite soluble factors induce *fadd* overexpression. *fadd* is well known for its implication in apoptosis pathway. FADD cleaves the procaspase-3 to produce active caspase-3, responsible for apoptosis (32,33). *fadd* is highlighted as a gene that orchestrates apoptosis in the extrinsic/death receptor pathway (34,35), ECs apoptosis could therefore result from this overexpression of the *fadd* gene. It is possible that other cell signaling events and stimuli from soluble mediators during the process of malaria infection may contribute to ECs apoptosis.

In our study, we found that *inos* transcript level was also impacted by the phenotype of adherence, but only when ECs and iRBC were in contact, suggesting that soluble parasite factors are not sufficient to activate *inos* expression. Again, overexpression was observed with CM isolates compared to UM isolates. *inos* is a major actor of the innate response against *P. falciparum* that is produced by various cells including macrophages, neutrophils, mast cells or endothelial cells which have the capacity to kill *Plasmodium* through nitric oxide derivatives production (26). Moreover, *inos* expression has also a protective role through the limitation of neutrophil recruitment to the site of inflammation and iRBC adherence to vascular endothelium on ICAM-1 and VCAM-1 (27). Initially, *inos* was induced through systemic TNF- α , IL-1 β , IL-6 or IFN- γ response but our *in vitro* model reveals that phenotype adherence influence induction of *inos* with a higher expression when CM isolates are used compared to UM's. Although *inos* expression is known to have a beneficial effect on parasite growth and cytoadherence, dysregulated *inos* expression could become neurotoxic due to prolonged and excessive amounts of NO production resulting in apoptosis induction through oxidative stress with the consequence of BBB disruption (36,37).

In the same way, iRBCs cytoadherence had an impact on endothelial activation of *vegfa*, a key regulator of angiogenesis promoting endothelium proliferation, cellular survival and reparation

but also induce vascular leakage. Increased VEGF production has also been reported because of hypoxia and vascular damage during acute malaria (38).

Direct contact between iRBC and Hbec-5i cells was not associated to overexpression of *casp3* and *casp9* apoptosis pathways as already described (8). Those results from our *in vitro* co-culture model were discordant from previous data. Indeed, **Pino et al** demonstrate that iRBCs adhesion on human endothelial cells (HLECs) induce apoptosis of HLECs by modulating apoptosis-related genes (*Bad, Bax, caspase-3, SARP 2, DFF45/ICAD, IFN-g receptor 2, Bcl-w, Bik, and iNOS*) in HLECs (8). Our data provide additional data as intracellular transduced signals for apoptosis induced by direct contact between iRBC and endothelial cells were not influenced by iRBC adherence phenotype. Others endothelial cellular model could also explain this differential result from the literature (38,8).

The observation that 6 hours co-culture of Hbec-5i with iRBCs did not induce any significant production of endothelial activation biomarkers in the supernatant was surprising because there is general agreement that ECs activation is important in the pathogenesis of CM. As already suggested, iRBCs cytoadherence do not seem to be the only explanation of the endothelial response observed (39). However, we can also suspect that 6 hours coincubation were not sufficient to induce protein secretion by ECs. Previous studies have shown that secreted parasitic factor preferentially produced by clinical isolates from patients with severe or uncomplicated malaria promoted an endothelial activation through exacerbated oxidative response, pro-inflammatory response, apoptosis activation and endothelial homeostasis modification (38,39–41). Common plasmodial proteins as hemozoin, parasitic DNA/histones complex, histidine rich protein-2 (HRP2) and glycosylphosphatidylinositol (GPI) have already been described to interact with the endothelium barrier with the consequence of inflammasome enhancing, oxidative stress and endothelial activation. Despite the fact that these types of potential soluble parasitic factors could be at the origin of the endothelial activation observed in CM pathogenicity, they do not have been investigated in our work. The difference in quantity of parasitic factors could also be excluded as the same number of parasites was initially used supposing no difference in specific secreted parasitic factors influenced by parasite phenotype on endothelial activation. In addition, data on cytokine/chemokine production after stimulation of endothelial cells are difficult to compare, as the types of co-culture and antigenic stimulation are different and endothelial cells may be of different types (e.g., Hbec-5i, HUVEC and HIMEC), which may influence the activation/secretion profile. Our results are consistent with

Viebig et al findings, which demonstrate that co-incubation of ECs (not activated with TNF- α) with iRBCs results in lower ICAM-1 levels in contrast to ICAM-1 levels of ECs co-cultured with iRBCs and activated with TNF- α . The iRBCs co-incubation with ECs also failed to up-regulate E-selectin and VCAM-1 (42). Hbec-5i co-culture with plasma from malaria patients (6 hours stimulation with plasma followed by 42h incubation) by *Raacke and al* resulted in significantly increased secretion of IL-11, CXCL5, CXCL8, CXCL10, vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) if compared to matching controls (healthy individuals) (38), thus supporting the hypothesis of the possible effect of soluble factors on endothelial cell activation. There is a growing interest in the study of extracellular vesicles (EVs) involved in intercellular communication. *Toda et al* demonstrated that EVs in plasma can affect pathogenesis of parasites. They characterized plasma-derived EVs from *P. vivax* patients and showed that PvEVs are preferentially taken up by human spleen fibroblasts, facilitating parasite cytoadherence. Moreover, this uptake induced specific upregulation of ICAM-1 associated with the translocation of NF- κ B to the nucleus (43). With an *in vitro* co-culture model of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with either iRBCs or uninfected uRBC, *Chakravorty et al* demonstrated a positive regulation of HUVEC activation by iRBCs and TNF (9).

Our results suggest that the cytoadherence/sequestration time (6 hours) of mature forms of iRBCs in the microvessels is not the only mechanisms that can lead to stimulation of ECs, inducing the production of various cytokines/chemokines. The strength of our study was the use of iRBCs from CM or UM patients, which brings us closer to the physiological conditions. The current study has some limitations. The main limit is the absence of an co-incubation time longer than 6 hours. In addition, the ECs used here are an immortalized endothelial cell lines, the study of primary ECs being difficult or even impossible for obvious ethical reasons. in the brain being difficult to study for obvious ethical reasons.

NeuroCM group.

Jules Alao (Pediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin); Dissou Affolabi (Pediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin);

Bibiane Biokou (Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, Benin);

Michel Cot (MERIT UMR 261, IRD, Université de Paris Cité, Paris, France); Jean-Eudes Degbelo (Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Calavi, Benin);

Philippe Deloron (MERIT UMR 261, IRD, Université de Paris Cité, Paris, France);

Latifou Dramane (Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Abomey Calavi, Benin);

Sayeh Jafari-Guemouri (MERIT UMR 261, IRD, Université de Paris Cité, Paris, France);

Anaïs Labrunie (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France);

Yélé Ladipo (Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, Benin);

Thomas Lathiere (Ophthalmology department, Limoges University Hospital, Limoges, France);

Achille Massougbdji (Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Abomey Calavi, Benin);

Audrey Mowendabeka (Paediatric Department, Hopital de la Mère et de l'Enfant, Limoges, France);

Jade Papin (MERIT UMR 261, IRD, Université de Paris Cité, Paris, France); Bernard Pipy (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France);

Pierre-Marie Preux (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France);

Marie Raymondeau (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France);

Jade Royo (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France);

Darius Sossou (Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Abomey Calavi, Benin);

Brigitte Techer (MERIT UMR 261, IRD, Université de Paris Cité, Paris, France).

Funding. This work was funded by the French National Research Agency (ANR-17-CE17-0001). The funding organization did not play any role in the trial design, data collection, analysis of results, or writing of the manuscript.

Competing interests. There are no conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

1. World Health Organization. World malaria Report. (2023). (Geneva: WHO). Available at: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023> (Accessed December 27, 2023).
2. Albrecht-Schgoer K, Lackner P, Schmutzhard E, Baier G. Cerebral malaria: current clinical and immunological aspects. *Front Immunol* (2022) 13:863568. doi: 10.3389/fimmu.2022.863568
3. Duffy F, Bernabeu M, Babar PH, Kessler A, Wang CW, Vaz M, et al. Meta-analysis of *Plasmodium falciparum* var signatures contributing to severe malaria in african children and indian adults. *mBio* (2019) 10:e00217-19. doi: 10.1128/mBio.00217-19
4. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* (1998) 91:3527–3561.
5. Pais TF, Penha-Gonçalves C. Brain Endothelium: The “innate immunity response hypothesis” in cerebral malaria pathogenesis. *Front Immunol* (2018) 9:3100. doi: 10.3389/fimmu.2018.03100
6. Zougbedé S, Miller F, Ravassard P, Rebollo A, Cicéron L, Couraud P-O, et al. Metabolic acidosis induced by *Plasmodium falciparum* intraerythrocytic stages alters blood-brain barrier integrity. *J Cereb Blood Flow Metab* (2011) 31:514–526. doi: 10.1038/jcbfm.2010.121
7. Abdi AI, Fegan G, Muthui M, Kiragu E, Musyoki JN, Opiyo M, et al. *Plasmodium falciparum* antigenic variation: relationships between widespread endothelial activation, parasite PfEMP1 expression and severe malaria. *BMC Infect Dis* (2014) 14:170. doi: 10.1186/1471-2334-14-170
8. Pino P, Vouldoukis I, Kolb JP, Mahmoudi N, Desportes-Livage I, Bricaire F, et al. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte adhesion induces caspase activation and apoptosis in human endothelial cells. *J Infect Dis* (2003) 187:1283–1290. doi: 10.1086/373992
9. Chakravorty SJ, Carret C, Nash GB, Ivens A, Szeszak T, Craig AG. Altered phenotype and gene transcription in endothelial cells, induced by *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells: pathogenic or protective? *Int J Parasitol* (2007) 37:975–987. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.02.006
10. Brown H, Hien TT, Day N, Mai NT, Chuong LV, Chau TT, et al. Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* (1999) 25:331–340. doi: 10.1046/j.1365-2990.1999.00188.x
11. Punsawad C, Maneerat Y, Chaisri U, Nantavisai K, Viriyavejakul P. Nuclear factor kappa B modulates apoptosis in the brain endothelial cells and intravascular leukocytes of fatal cerebral malaria. *Malaria Journal* (2013) 12:260. doi: 10.1186/1475-2875-12-260

12. Turner GDH, Morrison H, Jones M, Davis TME, Looareesuwan S, Buley ID, et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria. *Am J Pathol* (1994) 145:1057–1069.
13. Joste V, Maurice L, Bertin GI, Aubouy A, Boumédiène F, Houzé S, et al. Identification of *Plasmodium falciparum* and host factors associated with cerebral malaria: description of the protocol for a prospective, case-control study in Benin (NeuroCM). *BMJ Open* (2019) 9:e027378. doi: 10.1136/bmjopen-2018-027378
14. Joste V, Guillochon E, Fraering J, Vianou B, Watier L, Jafari-Guemouri S, et al. PfEMP1 A-Type ICAM-1-binding domains are not associated with cerebral malaria in beninese children. *mBio* (2020) 11:e02103-20. doi: 10.1128/mBio.02103-20
15. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* (2001) 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
16. Brown H, Turner G, Rogerson S, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux M, et al. Cytokine expression in the brain in human cerebral malaria. *J Infect Dis* (1999) 180:1742–1746. doi: 10.1086/315078
17. Storm J, Jespersen JS, Seydel KB, Szestak T, Mbewe M, Chisala NV, et al. Cerebral malaria is associated with differential cytoadherence to brain endothelial cells. *EMBO Molecular Medicine* (2019) 11:e9164. doi: 10.15252/emmm.201809164
18. Avril M, Tripathi AK, Brazier AJ, Andisi C, Janes JH, Soma VL, et al. 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:E1782–E1790. doi: 10.1073/pnas.1120534109
19. Claessens A, Adams Y, Ghumra A, Lindergard G, Buchan CC, Andisi C, et al. A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109:E1772–E1781. doi: 10.1073/pnas.1120461109
20. Mkumbaye SI, Wang CW, Lyimo E, Jespersen JS, Manjurano A, Mosha J, et al. The severity of plasmodium falciparum infection is associated with transcript levels of var genes encoding endothelial protein C receptor-binding *P. falciparum* erythrocyte membrane protein 1. *Infect Immun* (2017) 85:e00841-16. doi: 10.1128/IAI.00841-16
21. Tuikue Ndam N, Moussiliou A, Lavstsen T, Kamaliddin C, Jensen ATR, Mama A, et al. Parasites causing cerebral falciparum malaria bind multiple endothelial receptors and express EPCR and ICAM-1-binding PfEMP1. *The Journal of Infectious Diseases* (2017) 215:1918–1925. doi: 10.1093/infdis/jix230
22. Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JEV, Avril M, et al. Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature* (2013) 498:502–505. doi: 10.1038/nature12216
23. Pino P, Taoufiq Z, Nitcheu J, Vouldoukis I, Mazier D. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost* (2005) 94:336–340. doi: 10.1160/TH05-05-0354

24. Gill J, Sharma A. Structural and genomic analysis of single nucleotide polymorphisms in human host factor endothelial protein C receptor (EPCR) reveals complex interplay with malaria parasites. *Infection, Genetics and Evolution* (2023) 110:105413. doi: 10.1016/j.meegid.2023.105413
25. Tripathi AK, Sha W, Shulaev V, Stins MF, Sullivan DJ. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood* (2009) 114:4243–4252. doi: 10.1182/blood-2009-06-226415
26. Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB, Clark IA. Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun* (1991) 59:3280–3283.
27. Serirom S, Raharjo WH, Chotivanich K, Loareesuwan S, Kubes P, Ho M. Anti-adhesive effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under Flow. *Am J Pathol* (2003) 162:1651–1660.
28. Deramautd TB, Dill C, Bonay M. Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases. *Médecine et Maladies Infectieuses* (2013) 43:100–107. doi: 10.1016/j.medmal.2013.02.004
29. Ye J. Regulation of PPAR γ function by TNF- α . *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2008) 374:405–408. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.068
30. Borges TKS, Alves ÉAR, Vasconcelos HAR, Carneiro FP, Nicola AM, Magalhães KG, et al. Differences in the modulation of reactive species, lipid bodies, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and PPAR- γ in cerebral malaria-susceptible and resistant mice. *Immunobiology* (2017) 222:604–619. doi: 10.1016/j.imbio.2016.11.010
31. Kim IS, Silwal P, Jo E-K. Peroxisome proliferator-activated receptor-targeted therapies: challenges upon infectious diseases. *Cells* (2023) 12:650. doi: 10.3390/cells12040650
32. Baška P, Norbury LJ. The Role of nuclear factor Kappa B (NF- κ B) in the immune response against parasites. *Pathogens* (2022) 11:310. doi: 10.3390/pathogens11030310
33. Tripathi AK, Sullivan DJ, Stins MF. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. *Infect Immun* (2006) 74:3262–3270. doi: 10.1128/IAI.01625-05
34. Sena-dos-Santos C, Braga-da-Silva C, Marques D, Azevedo dos Santos Pinheiro J, Ribeiro-dos-Santos Â, Cavalcante GC. Unraveling cell death pathways during malaria infection: what do we know so far? *Cells* (2021) 10:479. doi: 10.3390/cells10020479
35. Sena-dos-Santos C, Cavalcante GC, Marques D, Silva CS, de Moraes MR, Pinto P, et al. Association of apoptosis-related variants to malaria infection and parasite density in individuals from the Brazilian Amazon. *Malar J* (2023) 22:295. doi: 10.1186/s12936-023-04729-6
36. Thiel VE, Audus KL. Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid Redox Signal* (2001) 3:273–278. doi: 10.1089/152308601300185223

37. Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, Dugas B, Mazier D. Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *plasmodium falciparum* -infected erythrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2003) 1010:582–586. doi: 10.1196/annals.1299.109
38. Raacke M, Kerr A, Dörpinghaus M, Brehmer J, Wu Y, Lorenzen S, et al. Altered cytokine response of human brain endothelial cells after stimulation with malaria patient plasma. *Cells* (2021) 10:1656. doi: 10.3390/cells10071656
39. Gallego-Delgado J, Rodriguez A. Rupture and Release: A role for soluble erythrocyte content in the pathology of cerebral malaria. *Trends Parasitol* (2017) 33:832–835. doi: 10.1016/j.pt.2017.06.005
40. Wilson N, Huang M, Anderson W, Bond V, Powell M, Thompson W, et al. Soluble factors from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells. *Molecular and Biochemical Parasitology* (2008) 162:172–176. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.09.003
41. Vásquez AM, Blair S, García LF, Segura C. *Plasmodium falciparum* isolates from patients with uncomplicated malaria promote endothelial inflammation. *Microbes and Infection* (2017) 19:132–141. doi: 10.1016/j.micinf.2016.09.006
42. Viebig NK, Wulbrand U, Förster R, Andrews KT, Lanzer M, Knolle PA. Direct activation of human endothelial cells by plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Infect Immun* (2005) 73:3271–3277. doi: 10.1128/IAI.73.6.3271-3277.2005
43. Toda H, Diaz-Varela M, Segui-Barber J, Roobsoong W, Baro B, Garcia-Silva S, et al. Plasma-derived extracellular vesicles from *Plasmodium vivax* patients signal spleen fibroblasts via NF-κB facilitating parasite cytoadherence. *Nat Commun* (2020) 11:2761. doi: 10.1038/s41467-020-16337-y

II-Étude de la réponse monocytaire des patients présentant un neuropaludisme

1. Introduction

Lors d'une infection palustre, les cellules immunitaires dont les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques jouent un rôle indispensable dans la protection de l'hôte contre *Plasmodium*. Dérivés des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, les monocytes sont libérés dans la circulation sanguine après maturation. Chez l'hôte infecté par *Plasmodium*, via le phénomène de phagocytose et de présentation de l'antigène, les monocytes sont directement impliqués dans les interactions avec les globules rouges infectés. La phagocytose est un processus qui implique l'absorption cellulaire de particules afin de faciliter l'élimination des cellules apoptotiques et des micro-organismes envahissants. Les phagocytes professionnels tels que les monocytes, les macrophages et les neutrophiles peuvent être activés pour exécuter efficacement cette fonction immunitaire. Sur la base des mécanismes de reconnaissance de la cible phagocytaire, la phagocytose peut être classée en deux catégories : opsonique et non opsonique. La phagocytose opsonique implique l'enrobage des antigènes par des protéines de l'hôte (opsonines) telles que les fragments de complément C3b ou C4b et les anticorps, suivi de la liaison de ces complexes aux récepteurs phagocytaires des cellules immunitaires pour favoriser l'internalisation. Dans la phagocytose non opsonique, les cibles phagocytaires se lient directement aux récepteurs de surface tels que le CD36, les récepteurs Toll-like (TLR) et le récepteur 3 du complément pour induire l'absorption. Ces récepteurs reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes des microbes, qui sont des molécules exclusivement exprimées par les microbes mais pas par les cellules hôtes.

La sévérité de l'infection palustre dépend de l'équilibre entre l'immunité protectrice et l'immunopathologie. Certains facteurs de l'hôte encore mal étudiés peuvent orienter l'immunité de l'hôte vers la protection ou la pathologie, contribuant ainsi à une susceptibilité et une réponse différentielle au paludisme. Une compréhension globale des interactions entre les monocytes et les parasites du paludisme *Plasmodium spp.* pourrait permettre d'améliorer la prise en charge et la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques.

En utilisant une approche *ex vivo*, le phénotype (répartition des sous-populations monocytaires), la fonctionnalité (capacité de phagocytose des monocytes) et le niveau d'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de phagocytose d'enfants béninois présentant soit un paludisme simple, soit un neuropaludisme a été étudié en lien avec la gravité du paludisme et son évolution.

Les résultats de l'étude de la réponse monocytaire des patients présentant un neuropaludisme sont présentés sous forme d'article en anglais, dont voici le résumé en français :

2. Monocytes and particularly non-classical ones lose their opsonic and non-opsonic phagocytosis capacity during pediatric cerebral malaria

2.1. Résumé

L'immunité innée est essentielle pour réduire la charge parasitaire et contribuer à la survie des patients atteints de paludisme grave. Les monocytes sont des acteurs clés de la réponse innée et, comme les macrophages, sont des cellules plastiques dont la fonction et le phénotype sont régulés par les signaux du microenvironnement. Dans le contexte du neuropaludisme, la réponse des monocytes reste une question importante à comprendre. Nous avons précédemment montré que la diminution des pourcentages de monocytes non-classiques dans le sang périphérique était associée au décès chez les enfants atteints de neuropaludisme. Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que la fonction de phagocytose des monocytes est influencée par la gravité de l'infection palustre. Pour étudier cette hypothèse, nous avons comparé la capacité de phagocytose opsonique et non opsonique des monocytes circulants d'enfants béninois atteints de paludisme simple et de neuropaludisme. Pour les enfants atteints de neuropaludisme, les échantillons de sang ont été prélevés à l'inclusion (J0), puis 3 et 30 jours après le traitement (J3, J30). La capacité de phagocytose des monocytes totaux et des sous-populations monocytaires a été caractérisée par cytométrie en flux et le profil transcriptionnel par l'étude de gènes connus pour leur implication dans l'élimination ou l'échappement immunitaire des globules rouges infectés (GRi). Nos résultats confirment notre hypothèse et mettent en évidence une plus grande capacité des monocytes non-classiques à phagocyter les GRi. Nous avons également confirmé que, comparés aux monocytes provenant du groupe paludisme simple, de faibles pourcentages de monocytes non-classiques étaient associés à la survenue du neuropaludisme, suggérant une mobilisation de cette sous-population vers le site inflammatoire (le cerveau). Enfin, nos résultats indiquent l'implication des récepteurs inhibiteurs LILRB1, LILRB2 et Tim3 dans le contrôle de la phagocytose. L'ensemble de ces données permet de mieux comprendre les interactions entre les monocytes et le parasite dans la pathogénicité du neuropaludisme.

2.2. Article II

vianou et al. – soumis à *Frontiers in Immunology* Dec- 2023

Monocytes and particularly non-classical ones lose their opsonic and non-opsonic phagocytosis capacity during pediatric cerebral malaria

Bertin Vianou^{1,2}, Jade Royo¹, Sébastien Dechavanne³, Gwladys I Bertin³, Akadiri Yessoufou⁴, Sandrine Houze^{3,5,6}, Jean Francois Faucher^{7,8} & Agnes Aubouy^{1,2*}, and NeuroCM group[§]

¹UMR152 PHARMADEV, IRD, UPS, Toulouse University, Toulouse, France.

²Clinical Research Institute of Benin (IRCB), Abomey Calavi, Benin.

³UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France.

⁴Cell Biology and Physiology Laboratory, Abomey Calavi University (UAC), Abomey Calavi, Benin.

⁵French Malaria Reference Center, APHP, Bichat Hospital, Paris, France.

⁶Parasitology Laboratory, APHP, Bichat-Claude-Bernard Hospital, Paris, France.

⁷Infectious Diseases and Tropical Medicine Department, Limoges University Hospital, Limoges, France.

⁸UMR 1094 EpiMaCT, Inserm, Limoges University Hospital, Limoges University, Limoges, France.

*Correspondence: Agnès Aubouy, agnes.aubouy@ird.fr

§The consortium members are listed at the end of the manuscript.

Abstract

Innate immunity is crucial to reduce parasite burden and contribute to survival in severe malaria. Monocytes are key actors of the innate response and, like macrophages, are plastic cells whose function and phenotype are regulated by the signals from the microenvironment. In the context of cerebral malaria (CM), monocyte response constitutes an important issue to understand. We previously demonstrated that decreased percentages of non-classical monocytes were associated with death outcome in CM children. In the current study, we postulated that monocyte phagocytosis function is impacted by the severity of malaria infection. To study this hypothesis, we compared opsonic and non-opsonic phagocytosis capacity of circulant monocytes from Beninese children with uncomplicated malaria (UM) and CM. For the CM group, samples were obtained at inclusion (D0), and 3 and 30 days after treatment (D3, D30). Phagocytosis capacity of monocytes and their subsets were characterized by flow cytometry and transcriptional profiling by studying genes known for their functional implication in infected-red blood cells (iRBC) elimination or immune escape. Our results confirm our hypothesis and highlight the higher capacity of non-classical monocytes to phagocyte iRBC. We also confirm that a low number of non-classical monocytes is associated to CM outcome when compared to UM, suggesting a mobilization of this subpopulation to the cerebral inflammatory site. Finally, our results report the implication of the inhibitory receptors LILRB1, LILRB2 and Tim3 in phagocytosis control. Taken together, these data provide a better understanding of the interplay between monocytes and malaria infection in the pathogenicity of CM.

Keywords: cerebral malaria, monocyte, non-classical monocytes, phagocytosis, children, Benin, flow cytometry

INTRODUCTION

Malaria remains one of the most common vector-transmitted diseases, leading to a high morbidity and mortality rate. In 2022, there were roughly 249 million cases of malaria in Africa resulting in 608,000 deaths. Children under 5 accounted for about 80% of all malaria deaths in this region (1). Among the five species that infect humans, *Plasmodium falciparum* is by far the species most responsible for complications (2). Cerebral malaria (CM) is the major lethal complication of *P. falciparum* infection in addition to severe malarial anemia (SMA). This neurological syndrome occurs in about 1% of infections and is responsible for more than a quarter of malaria deaths annually among children under 5 years old in sub-Saharan Africa (3).

CM is a fatal neurological complication of *P. falciparum* malaria characterized by brain tissue hemorrhages and accumulation of infected red blood cells (iRBCs) and immune cells in brain microvessels, which can lead to blood brain barrier (BBB) disruption and death (4). Although sequestration is thought to be the hallmark of CM, the mechanisms involved in the pathophysiology are still incompletely understood. Over the past 15 years, it has become clearer that monocytes play an important role in protective immunity against malaria. However, while activation of the innate immune response is necessary to control blood-stage infection, excessive activation of monocytes have also been implicated in the pathogenesis of severe disease (5,6).

Based on levels of expression of CD14 (LPS co-receptor) and CD16 (low affinity Fcγ receptor III), circulating human monocytes are a heterogeneous population comprising three subsets called classical, intermediate and non-classical monocytes. Classical monocytes are the most predominant in homeostatic conditions (around 87% in healthy children (7)) and are defined by high expression levels of CD14 on their surface and no surface expression of CD16 (CD14⁺CD16⁻). The intermediate monocytes are characterized by high surface expression of CD14 and CD16 (CD14⁺CD16⁺), whereas the non-classical monocytes express very low expression of surface CD14 and high levels of CD16 (CD14^{low}CD16⁺) (8,9). It has been shown that the proportions of these subpopulations vary according to the severity of the malaria infection. Acute uncomplicated malaria (UM) was associated with an expansion of intermediate CD14⁺CD16⁺ monocytes (10), while our team reported decreased proportions of circulating non-classical monocytes in children with CM and in children who died from CM or SMA (11).

While all three monocyte subsets are capable of phagocytosis, data suggest differences in the subset phagocytosis capacity (10). A previous phagocytic assay performed *in vitro* revealed

that intermediate CD14⁺ CD16⁺ monocytes were the most effective subset for phagocytosis of *P. vivax* infected reticulocytes (12) and complement opsonized *P. falciparum* iRBCs (13). With leucocytes from donors living in a non-endemic malaria area and plasma from immune donors, **Garcia-Senoisiain *et al.*** showed that non-classical monocytes were the most efficient to phagocyte opsonized merozoites but most of phagocytosis was accomplished by the less efficient ones, the classical monocytes, due to their very higher proportion (14).

In the current study, we postulated that monocyte phagocytosis function is impacted by the severity of malaria infection. We then compared opsonic and non-opsonic phagocytosis capacity of circulant monocytes from Beninese children with UM and CM. For CM group, samples were obtained at inclusion (D0), and 3 and 30 days after treatment (D3, D30). Phagocytosis capacity of monocytes and their subsets were characterized by flow cytometry and transcriptional profiling by studying genes known for their functional implication in iRBCs elimination or immune escape. Our results confirm our hypothesis and highlight the higher capacity of non-classical monocytes to phagocyte iRBC. We also report the implication of the inhibitory receptors LILRB1, LILRB2 and Tim3 in phagocytosis control.

MATERIALS AND METHODS

Study design and participants

The study is part of NeuroCM project, whose goal was to identify the causative factors of neuroinflammation in the context of CM. NeuroCM project protocol was previously described (15). Briefly, patients were included from March to December 2018. Children were included if they were between 2 months and 6 years old and suffered from CM or UM. Children with CM were enrolled in two reference hospitals from southern Benin, the “Centre Hospitalier Universitaire Mère et Enfant Lagune” (CHU-MEL) in Cotonou, and the “Centre Hospitalier Universitaire de Zone d’Abomey Calavi/Sô-Ava” (CHUZAS) in Abomey-Calavi, located 25 km north of Cotonou. UM recruitment was carried out in Sô-Ava district. CM was defined as 1) deep coma (Blantyre Coma Score ≤ 2), 2) *P. falciparum* infection confirmed by microscopy, and 3) no other known cause of coma (e.g., acute bacterial meningitis, coma related to hypoglycaemia reversed by glucose infusion, status epilepticus, pre-existing neurological disease, traumatic or toxic coma). UM was defined as 1) fever at inclusion or within 24 hours before, 2) no clinical or biological sign of severe malaria as defined by the WHO (16), 3) no danger signs and no other obvious cause of fever, and 4) *P. falciparum* parasitaemia between 1000 to 500,000 parasites per microliter. A negative HIV rapid

diagnostic test was also required for children to participate in the study. For the present study of monocyte functionality, we used 19 patients per group, adjusted for age and sex.

Study approval

Informed consent was obtained from all participants parents or their guardians. Ethics approval for the NeuroCM study was obtained from the Comité National d’Ethique pour la Recherche en santé of Benin (n°67/ MS/DC/SGM/DRFMT/CNERS/SA; 10/17/2017). The study has also been approved by the Comité consultatif de déontologie et d’éthique of Institut de Recherche pour le Développement (IRD; 10/24/2017).

Clinical follow-up and blood sampling

As described elsewhere (17), CM children were followed from inclusion (D0) to 30 days after inclusion (D30), including a daily clinical monitoring until hospital discharge and a final clinical check at D30. Children presenting with UM were seen only at inclusion (D0). peripheral venous blood was collected in a vacutainer tube containing EDTA, and processed within 4 hrs, at D0 for both children groups and also at D3 and D30 for the CM children. As detailed before, blood samples were processed for research, hematologic, biochemistry analyses, and microbiological analyses. *P. falciparum* infection was confirmed by Real-Time PCR and microbiological coinfections were ruled out through large biological investigations based on blood culture and bacterial culture of cerebrospinal fluid (see details in reference 17).

***P. falciparum* culture**

Asexual stages of *P. falciparum* strain FCR3 were maintained in 0 Rh+ erythrocytes and reduced to 5% hematocrit in flasks containing RPMI medium supplemented with 0.5 % AlbuMAX II, 200M-glutamine, 25 mM HEPES, 10 g/mL gentamicin (all purchased in Thermofischer, Illkirch, France), 0.2 mM hypoxanthin (Merck, Saint-Quentin-Fallavier, France) and 2% human AB serum male (Biowest, Nuaille, France). The flasks were then gassed with the nitrogen mixture (N₂ 92.5%, O₂ 2% and 5.5% CO₂) and incubated at 37°C between 18 to 24 hours until parasites mature forms (late trophozoites and schizonts) were predominant (> 50%). Parasite cultures were enriched for knob-expressing strains using 0.75% gelatin sedimentation every 2 weeks.

Opsonic and non-opsonic phagocytosis

Patient blood samples were processed to isolate peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) using Ficoll-Paque PLUS Media (GE Healthcare®, Chicago, Illinois, USA) before cryopreservation. iRBCs at late stages were enriched using MACS magnetic columns (Miltenyi Biotec®, Bergisch Gladbach, Germany). 10^7 iRBCs/mL were labeled with 5 μ M CFSE (CellTrace CFSE, ThermoFisher Scientific) for 20 minutes at 37°C with shake and washed twice.

For non-opsonic phagocytosis, CFSE-labeled iRBCs (2.10^6 iRBCs/mL) were incubated with thawed PBMCs (concentration 2.10^6 cells/mL) at a 10:1 ratio of iRBCs:Monocytes in cell culture medium (RPMI-1640 with 2 mM L-glutamine, 10% FBS). CFSE-labeled iRBCs incubated with THP1 cells were used as positive control. Since iRBCs purification show day-to-day variations in yield of magnet purification, the amount of residuals uninfected red blood cells (uRBCs) remaining after MACS enrichment was calculated and this amount of uRBCs was incubated with participant's thawed PBMCs as blank control for each non-opsonic phagocytosis assays.

For opsonic phagocytosis, pooled plasma from 8 malaria-immune Beninese adults was used for opsonization. CFSE-labeled iRBCs (2.10^6 iRBCs/mL) were opsonized with heat-inactivated plasma (at a final plasma concentration of 1:10) for 1 hour and then washed in RPMI-Hepes. Opsonized CFSE-labeled iRBCs were incubated as before with thawed PBMCs. Opsonized CFSE-labeled iRBCs incubated with THP1 was used as positive control. Residual opsonized CFSE-labeled uRBCs incubated with participant's PBMCs was used as blank control.

The cells were incubated in polypropylene tubes for 40 minutes at 37°C, in 5% CO₂, on an orbital shaker. After incubation, the cells were placed on ice and washed in PBS-2 mM EDTA. PBMCs were stained for 15 minutes in the dark with LIVE/DEAD Viability 405/520 Fixable Dye followed by 20 minutes at 4°C staining with APC-Vio770-labeled anti-CD16 (REA423; Miltenyi Biotec) and APC-labeled anti-CD14 (REA599; Miltenyi Biotec). Cells were fixed using PFA 4% and subjected to flow analysis using an Fortesa flow cytometer (BD Biosciences). A minimum of 20,000 cells CD14⁺ was acquired. The percentage of phagocytosis was calculated according to the monocytes with CFSE fluorescence. To compare the phagocytosis capacity of monocytes between follow-up points, and avoid day-to-day experimental variation in phagocytosis assays, opsonic and non-opsonic phagocytosis assays were run in the same-day assay for each sample from acute CM (CM D0) and their own samples collected 3 days (CM D3) and 30 days (CM D30) following treatment and their matched UM.

Monocyte transcriptional profiles

Thawed PBMCs (500,000/well) were plated in 48 wells plates in culture medium and allowed to adhere in a 5% CO₂ container at 37°C for 2 hours. Non-adherent cells were removed by thorough washing with RPMI-1640. Adherent cells were lysed with 100 µL of lysis solution and total RNA was extracted using the RNAqueous®-Micro Kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Genes coding for Fc-gamma receptors (FcγRI, also called CD64, and FcγRIII, also called CD16), complement receptors (CR1, also called CD35 and CR3, also called CD11b), pattern recognition receptors (CD36, CD206, TLR2, CD163) and inhibitory immune checkpoint receptors (LILRB1, LILRB2, Tim3) were amplified by qPCR on Quant Studio 5 (Applied Bio System). PCR conditions were 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, then 40 cycles (95°C for 15 seconds, 60°C for 60 seconds) followed by a dissociation step from 65°C to 95°C. Using β-actine as housekeeping gene and monocytes from healthy children as control sample, Pfaffl method was used to calculate the relative expression of monocytes transcripts. Primers sequences are summarized in **Supplementary Table 1**.

Supplemental Table 1: Forward and reverse primer sequences used for determination of monocyte transcript levels

Genes	Forward sequences (5'→3')	Reverse sequences (5'→3')
CD64 (FcγRI)	ATACAGGTGCCAGAGAGGTCTC	CCAGCTTATCCTTCCACGCATG
CD16a (FcγRIIIA)	GGTGACTTGTCCACTCCAGTGT	ACCATTGAGGCTCCAGGAACAC
CR1	TAGGTGTCAGCCTGGCTTTGTC	GACATCTGGAGGTGGCTGACAT
CR3	GGAACGCCATTGTCTGCTTTCG	ATGCTGAGGTCATCCTGGCAGA
CD163	CCAGAAGGAACTTGTAGCCACAG	CAGGCACCAAGCGTTTTGAGCT
CD36	CAGGTCAACCTATTGGTCAAGCC	GCCTTCTCATCACCAATGGTCC
CD206	AGCCAACACCAGCTCCTCAAGA	CAAACGCTCGCGCATTGTCCA
TLR2	CTTCACTCAGGAGCAGCAAGCA	ACACCAGTGCTGTCCTGTGACA
LILRB1	CTCCCTATGAGTGGTCTCTACC	CTGTTGTAGCCAGCATCAGAGC
LILRB2	GTGTGGTCTTCACCCAGTGATC	AGCCGACATCAGAGACACACTG
Tim3	GACTCTAGCAGACAGTGGGATC	GGTGGTAAGCATCCTTGAAAGG
Beta-actin	GTGGCCGAGGACTTTGATT	ATGCTATCACCTCCCCTGTG

Primers sequences were designed on Origene website and ordered from IDT, France.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed on GraphPad Prism software (version 10.1.0). For descriptive analysis, quantitative variables were presented as the means ± standard deviations or medians interquartile ranges, and qualitative variables were presented as frequencies

(percentages). Kruskal-Wallis test with Dunn's test for multiple comparisons and Mann-Whitney U test were used to compare the percentages of phagocytosis and genes ratio between the four groups (CM D0, CMD3, CMD21 and UM). To evaluate correlations between phagocytosis capacity of monocytes and gene expression level, the non-parametric Spearman correlation test was used. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Clinical and blood count characteristics of the children studied

The clinical and biological characteristics of the children studied are presented in **Table 1**, according to their clinical group. Each group comprised 14 females and 5 males with a mean age around 49 months for both groups. Axillary temperature and parasitemia were also similar in the two groups. All children in the CM group were characterized by low hemoglobin levels with a mean of 5.7 g/dL (± 2.0). Higher absolute counts of leukocyte, lymphocytes, neutrophils, and eosinophils were related to malaria severity ($P = 0.0024$, $P = 0.03$, $P = 0.001$, and $P = 0.02$, respectively), in contrast to basophils and thrombocytes whose low levels were associated with CM. The absolute counts of monocytes were slightly higher in the UM group, but this difference was not significant, allowing us to exclude any possible relationship between our results and the monocyte counts of our patients. For biochemistry factors, glucose and creatinine levels were not related to the clinical group.

TABLE 1: Sociodemographic characteristics of the study population

	CM (n = 19)	UM (n = 19)	P-value ^a
Gender, n/n total (%)			
Female	14/19 (73.7)	14/19 (73.7)	> 0.9999
Male	5/19 (26.3)	5/19 (26.3)	
Age in months, mean (\pm SD ^b)	48.73 (\pm 11.5)	49.58 (\pm 11.9)	0.46
Male	50.3 (\pm 9.8)	50.6 (\pm 10.6)	0.73
Female	48.2 (\pm 11.7)	49.2 (\pm 12.8)	0.47
Weight in kg, mean (\pm SD)	13.6 (\pm 2.7)	14.7 (\pm 2.8)	0.17
$^{\circ}$ C axillary temperature, mean (\pm SD)	38.36 (\pm 1.2)	37.92 (\pm 1.2)	0.42
<i>P. falciparum</i> density/ μ l of blood, median (IQR ^c)	35 700 (3 343 - 137 983)	19 776 (6 676 - 86 180)	0.77
Mean hemoglobin level in g/dL (\pm SD)	5.7 (\pm 2.0)	8.9 (\pm 1.7)	< 0.0001
Haemoglobin level < 11, n/n total (%)	19/19 (100)	17/19 (89.5)	< 0.0001
Hematocrit, mean (\pm SD)	16.7 (\pm 6.5)	27.9 (\pm 4.4)	< 0.0001
Leucocytes $\times 10^3/\mu$ l, mean (\pm SD)	13.7 (\pm 10.6)	8.04 (\pm 5.8)	0.002
Lymphocytes $\times 10^3/\mu$ l, mean (\pm SD)	4.7 (\pm 4.7)	2.3 (\pm 1.2)	0.03
Monocytes $\times 10^3/\mu$ l, mean (\pm SD)	0.6 (\pm 0.5)	0.9 (\pm 0.7)	0.08
Neutrophils $\times 10^3/\mu$ l, mean (\pm SD)	8.2 (\pm 6.1)	4.7 (\pm 5.3)	0.001
Eosinophils $\times 10^3/\mu$ l, mean (\pm SD)	0.2 (\pm 0.2)	0.05 (\pm 0.1)	0.02
Basophils $\times 10^3/\mu$ l, mean (\pm SD)	0	0.03(\pm 0.04)	0.02
Thrombocytes $\times 10^3/\mu$ l, mean (\pm SD)	99.8 (\pm 52.7)	210.6 (\pm 151.5)	0.002
Glucose in g/L, mean (\pm SD)	1.08 (\pm 0.8)	0.9 (\pm 0.2)	0.93
Creatinine in mg/L, mean (\pm SD)	4.1 (\pm 2.1)	3.2 (\pm 0.3)	0.13
Blantyre score (n)			
0	0	NA	
1	4	NA	
2	15	NA	

^aStatistical differences between clinical groups were calculated using the Mann–Whitney U test for quantitative variables, Pearson’s Chi2 test for qualitative variables. P-values < 0.05 are indicated in bold. ^bSD : standard deviation. ^cIQR : interquartile range NA, non-attributable.

Decrease of non-classical monocyte subset in peripheral blood is associated with acute CM

Based on the expression level of CD14 and CD16 on their surface, classical, intermediate and non-classical subsets were identified by flow cytometry (**Figure 1A**). The percentages of monocyte subsets were compared according to the clinical group (CM, UM) and the time of follow-up for the CM children (D0, D3, D30). Compared to UM, percentages of classical monocytes appear to be higher during acute CM (**Figure 1B**). Although the percentages of classical monocytes appeared increased for CM at D0 and D3, they remained around the values

of the physiological state (median percentage for CM D0 = 94.5%, for CM D3 = 93.2%, **Figure 1B**). The percentages of intermediate monocytes were similar in both clinical groups and during follow-up in CM (**Figure 1C**). Conversely, the percentage of non-classical monocytes in CM at inclusion was far below those of the UM group ($P < 0.0001$, **Figure 1D**). Interestingly, the respective percentages of classical and non-classical monocytes gradually returned at D3 and then D30 to levels comparable to those in the UM group, with levels statistically different from those of CM at inclusion ($P < 0.0001$ and $P = 0.0002$, respectively) (**Figure 1B, D**).

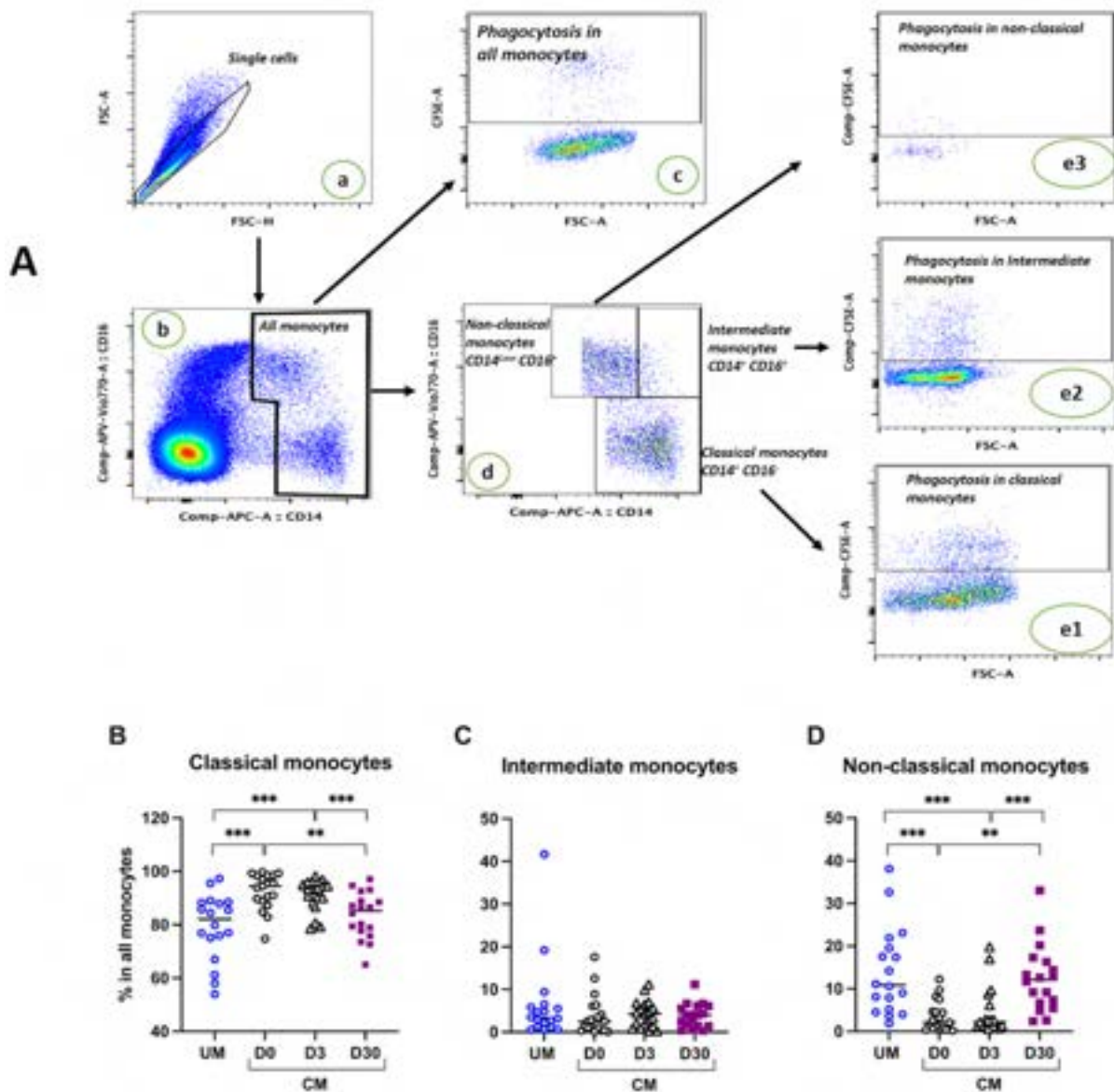


FIGURE 1: Cerebral malaria (CM) resolution is associated with a decrease of the classical monocyte subset and an expansion of the non-classical subset. (A) Gating strategy to determine proportions of monocyte subsets and phagocytotic monocytes. After exclusion of dead cells based on live dead staining, doublets were excluded (a) and monocyte population were gated based on CD14 and CD16 staining (b). Phagocytosis proportion of all monocytes was determined based on CFSE labeling (c). Among monocytes, proportions of the 3 subsets were determined based on CD14 and CD16 expression level (d). Phagocytosis proportion in each subset was determined based on CFSE labeling (e1, e2, e3). Proportions of classical (B), intermediate (C), and non-classical monocytes (D) are shown for children presenting uncomplicated malaria (UM) or CM at inclusion (D0), and three and thirty days after inclusion (D3, D30). Proportions were compared by Mann-Whitney U-test, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$.

Acute CM is associated with impaired monocyte phagocytosis of iRBCs

Monocytes are known for their ability to reduce parasite burden through phagocytosis. We postulated that CM could modify phagocytic capacity of monocytes. Non-opsonic and opsonic phagocytic activity of the participants' monocytes were assessed during acute UM, acute CM (CM D0), and 3 and 30 days following inclusion for the CM group (CM D3 and D30) (**Figure 2**). Interestingly, opsonic and non-opsonic phagocytic activity of total monocytes (**Figure 2A, B**) was decreased during acute CM (CM D0) and three days after inclusion (CM D3) compared to that of UM monocytes or CM monocytes at D30. In the CM group, both phagocytic capacities were recovered at D30 to reach a level similar to that of UMs. The difference was particularly marked for non-opsonic phagocytosis (median values 2.05% phagocytosis for CM D0 vs 2.35% for CM D3 and 18.1% for CM D30, **Figure 2A**).

To go further, we then measured the capacity of each monocyte subset to phagocyte iRBC, according to their clinical group and time of sampling (**Figure 2C, D**). First, it is interesting to note that non-classical monocytes were the most capable of non-opsonic and opsonic phagocytosis, compared with classical and intermediate monocytes in UM and CM children (for non-opsonic phagocytosis in UM and CM: non-classical vs intermediate and classical monocytes, $P < 0.0001$; for opsonic phagocytosis in UM: non-classical vs intermediate and classical monocytes, $P < 0.0001$; for opsonic phagocytosis in CM: non-classical vs intermediate and classical monocytes, $P < 0.0001$ and $P = 0.0002$, respectively; **Figure 2C, D**). This observation was also true in the CM group during follow-up ($P < 0.0001$ for all comparisons). Then, we compared phagocytosis capacity of each subpopulation between clinical conditions (CM vs UM at D0) and between time of sampling (D0 vs D3 vs D30). For non-opsonic phagocytosis, for the CM D0 and CM D3 groups, a lower capacity of the monocytes of the 3 subpopulations was observed compared with the respective subpopulations of the UM group (**Figure 2C**). For opsonic phagocytosis, such comparison was true only for non-classical monocytes from CM D0 compared to that of UM (**Figure 2D**). For non-opsonic phagocytosis, monocyte capacity of phagocytosis for each subset was recovered at D30 in the CM group, without any difference between D0 and D3 capacities (**Figure 2C**). For opsonic phagocytosis, non-classical monocytes also recovered their capacity to phagocyte with difference observed between D0 and D3 (median values 8.2% vs 12.3%, $P = 0,006$) and D0 and D30 (median values 8.2% vs 17.0%, $P = 0,0003$).

The last two graphs show the respective contribution of each sub-population to the phagocytosis capacity of total monocytes (**Figure 2E, F**). We observed that the classical monocytes, also the less efficient to phagocyte iRBC, contributed most to iRBC non-opsonic

and opsonic phagocytosis. This higher contribution was true in UM and CM groups and also at D3 and D30 in CM children. This result is due to the much greater proportion of classical monocytes compared with the other two sub-populations in both clinical groups and at each time point (**Figure 1**).

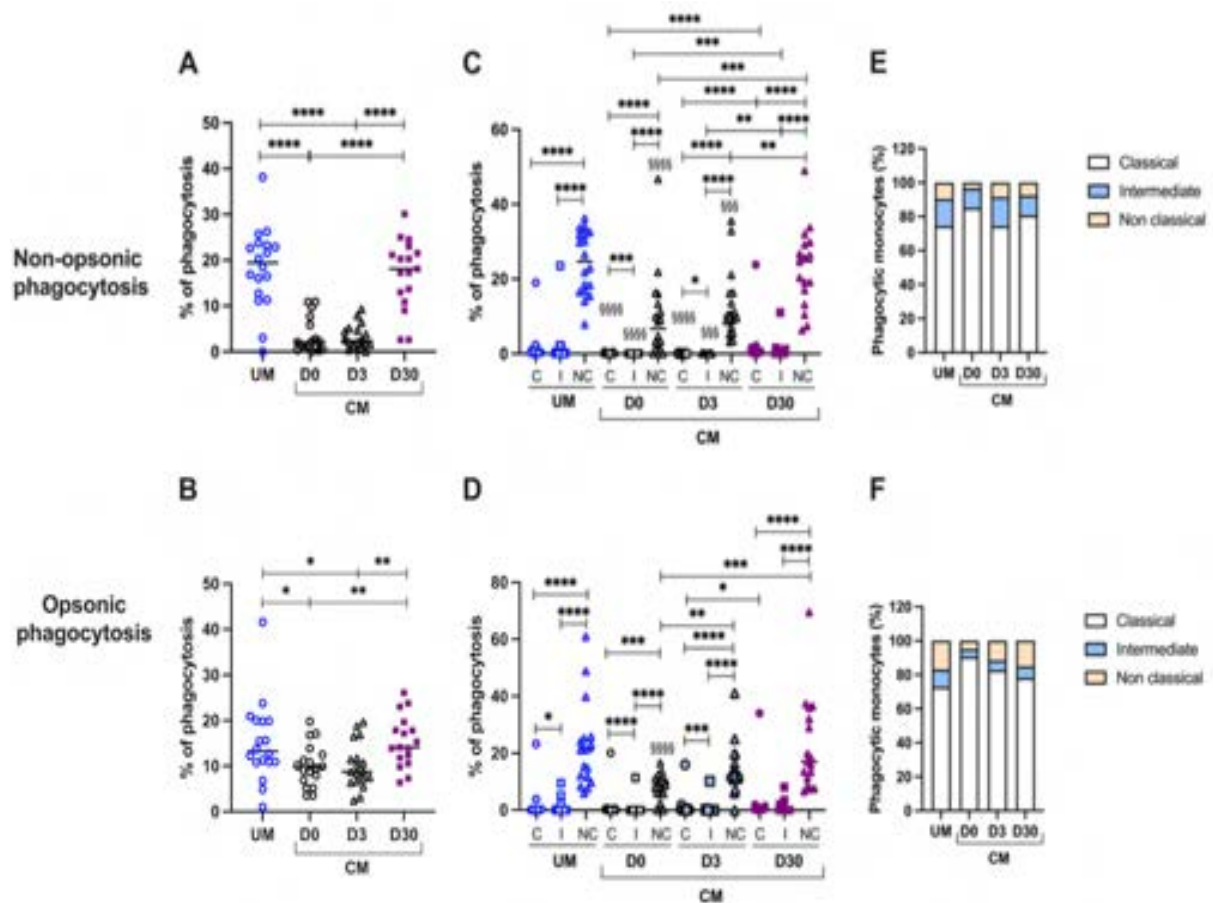


FIGURE 2: Decreased phagocytosis activity of monocytes, and particularly non-classical ones, is associated with cerebral malaria (CM). Proportions of non-opsonic phagocytosis (A), opsonic phagocytosis (B) were calculated among total monocytes. Proportions of non-opsonic and opsonic phagocytosis in each monocyte subset (C, D) were evaluated for each monocyte subset as the ratio of the number of monocytes in the subpopulation having phagocytosed to the total number of monocytes in the subpopulation. § shows comparisons of the level of phagocytosis of each monocyte subpopulation in the CM group with the corresponding subpopulation in the UM group. UM: uncomplicated malaria, D0: Day of inclusion, D3: Day 3 after inclusion, D30: Day 30 after inclusion. Proportions were compared by Mann-Whitney U-test. One symbol $P < 0.05$, two symbols $P < 0.01$, three symbols $P < 0.001$

Monocyte transcriptional profiles and relation with cerebral malaria

Using RT-qPCR, 11 genes implicated in the phagocytosis process were analyzed. Two Fcγ receptors were studied: FcγRI (also called CD64) known for its high affinity binding capacity to monomeric IgG, and FcγRIII (also called CD16) known for its implication in antibody-dependent cellular cytotoxicity, an important way of iRBC elimination (18,19). To investigate complement implication, complement receptors CR1 and CR3 expression level was measured, known for their capacity to recognize opsonins bound to antigens or immune complexes (20,21). Three scavenger receptors were also studied, CD36, known for its implication in non-opsonic phagocytosis of iRBCs; CD206 (also called Mannose receptor 1) known for its implication in the phagocytosis of pathogens such as *Leishmania* and in a lower rate of *P. falciparum*-iRBCs (22), and in the M2-like phenotype; and CD163, known for its implication in the hemoglobin-haptoglobin complex elimination, an important step of detoxification during malaria. TLR2, a toll-like receptor, is also a pattern-recognition receptor as the scavenger receptors. Known for its collaboration with CD36 and CD163 in activating signaling pathways and enhancing iRBC internalization (23), we also studied its expression. Finally, LILRB1, LILRB2 and Tim3 expressions were evaluated, as key inhibitory receptors implicated in the balance between immune tolerance and immune responses to infectious diseases (24–26).

Monocyte transcriptional profiles were compared between clinical origin (CM and UM) and between times of follow up in the CM group. **Figure 3** shows the results of gene expression in total monocytes. Compared to UM's monocytes, monocytes from CM children at D0 expressed lower CD16, CR1, CR3 and Tim3. For these 4 genes, expression levels were gradually restored at D30, to comparable levels as those of UM's monocytes (**Figure 3B, C, D, K**), suggesting an inhibition of these 4 genes at D0 in the CM group. Although no difference was observed between TLR2 expression at D0 between CM and UM groups, its expression profile was similar with an increase between D3 to D30 in the CM group (**Figure 3H**). Conversely, CD64, CD206, CD163 and LILRB2 had decreasing expression from D0 to D30 in the CM group, with comparable expression levels between CM and UM's monocytes at D0, suggesting an activation of these genes in CM's monocytes at D0 (**Figure 3A, F, G, J**).

To understand whether the genes studied were involved in the phagocytosis of monocytes from UM and CM patients, the correlation between their expression levels and phagocytosis capacity was assessed. Interestingly, for the CM group, significant correlations were found at D30 only suggesting that phagocytosis at D0 was too disrupted to find any correlation. At D30, non-opsonic phagocytosis capacity of monocytes from CM children was inversely related to CR3, CD163, LILRB1, LILRB2 and Tim3 expression, as shown on **Figure 4A-C** ($P = 0,005$,

$r = -0,67$; $P = 0,028$, $r = -0,55$; $P = 0,044$, $r = -0,51$; $P = 0,019$, $r = -0,60$; $P = 0,0005$, $r = -0,80$; respectively). For opsonic phagocytosis at D30, such relation was found only for LILRB1 and LILRB2 ($P = 0,002$, $r = -0,74$; $P = 0,029$, $r = -0,57$) (**Figure 4D**). In the UM group, the capacity of monocytes to phagocyte iRBC by non-opsonic phagocytosis was inversely related to Tim3 expression ($P = 0,014$, $r = -0,59$, **Figure 4C**), but no such relation was found for opsonic phagocytosis. These results suggest the involvement of these 5 genes in the control of phagocytosis.

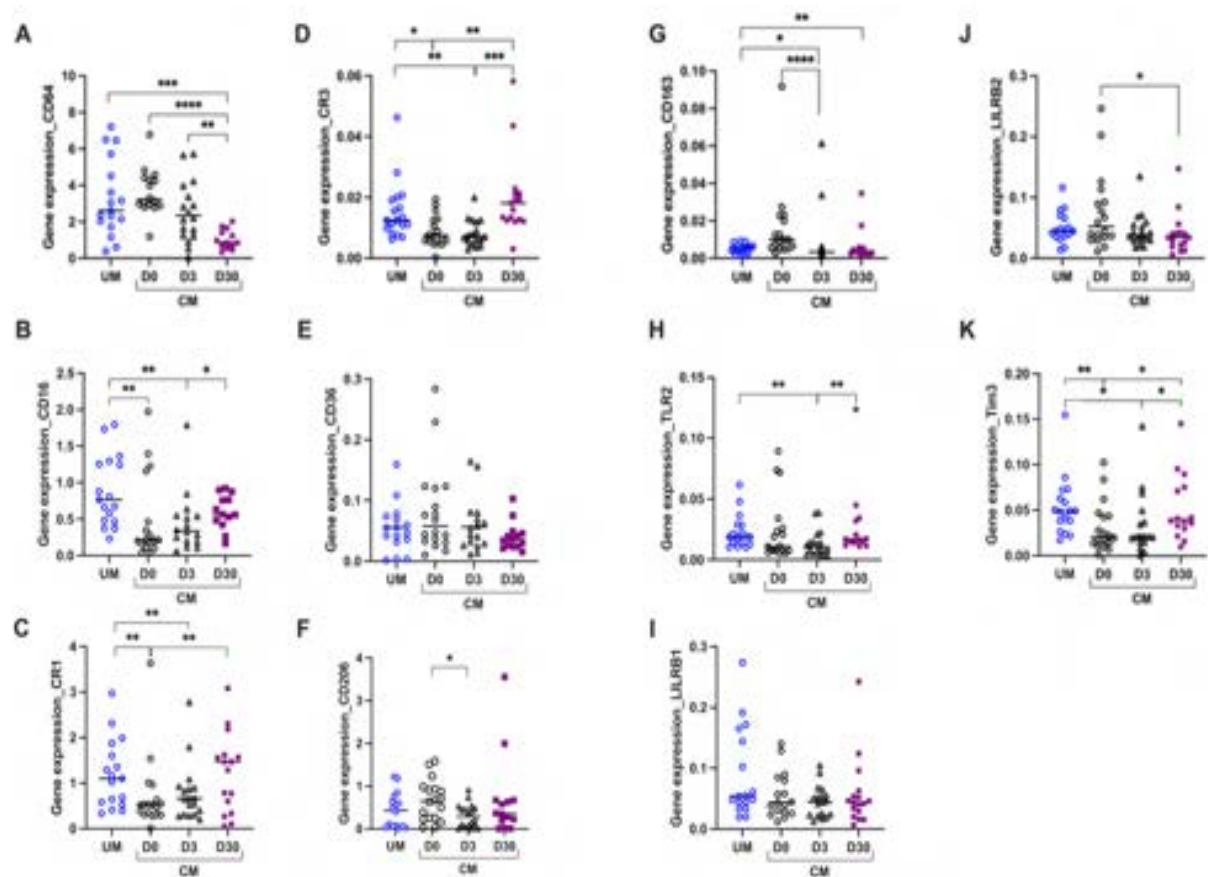


FIGURE 3: Altered monocyte gene profiles are associated with acute cerebral malaria (CM). CD64 (A), CD16 (B), CR1 (C), CR3 (D), CD36 (E), CD206 (F), CD163 (G), TLR2 (H), LILRB1 (I), LILRB2 (J), and Tim3 (K) transcript levels were evaluated by RT-qPCR in total monocytes from children presenting with uncomplicated malaria (UM) or CM at inclusion (D0), and three and thirty days after inclusion (D3, D30). Gene expression levels were calculated using the Pfaffl method and are expressed as ratio. Ratios were compared by the Mann-Whitney U-test, **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

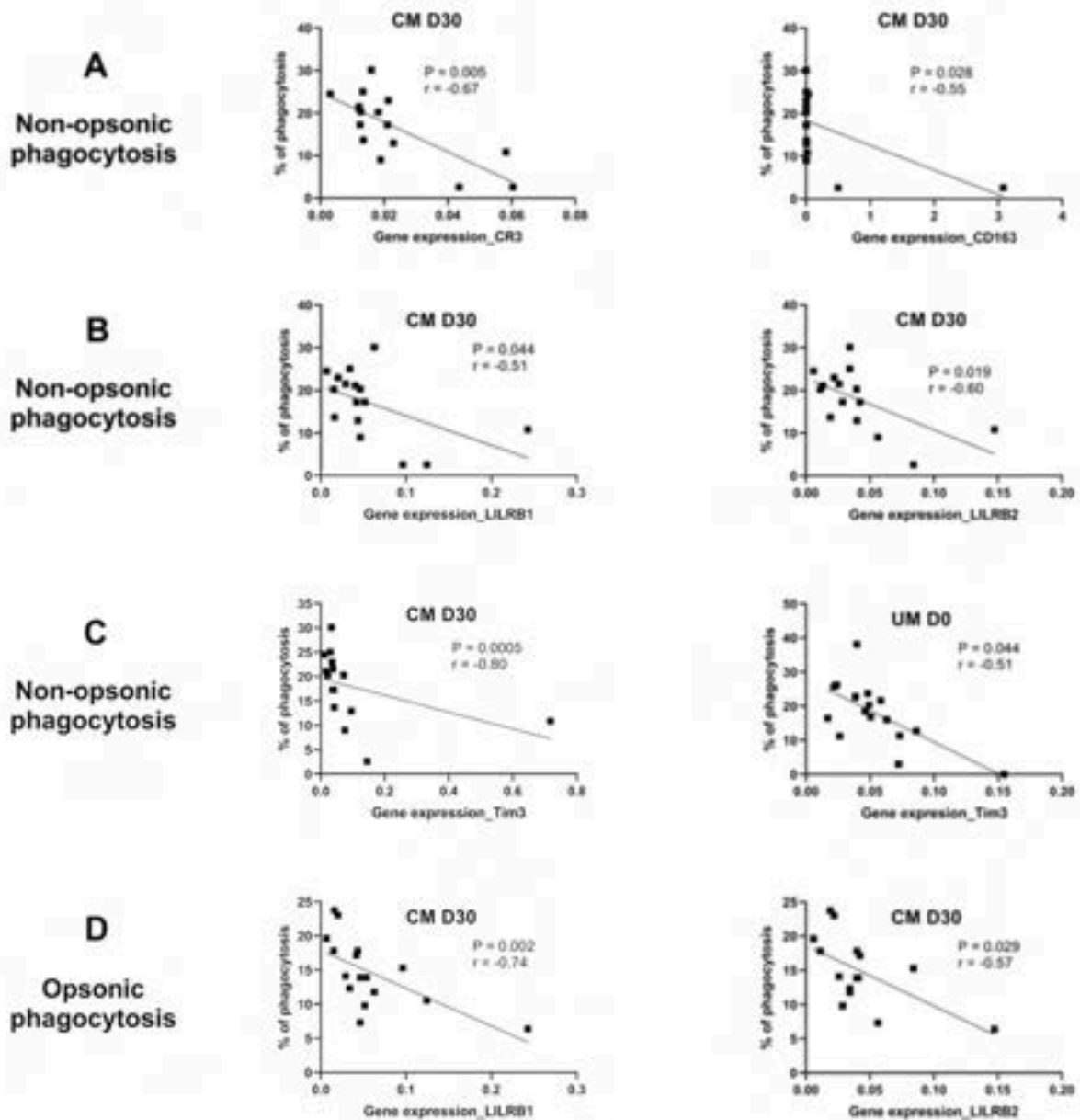


FIGURE 4: CR3, CD163, LILRB1, LILRB2 and Tim3 gene expression are related to phagocytosis control during cerebral malaria (CM). The Spearman correlation test was used to evaluate the relation between phagocytosis capacity of monocytes and gene expression level in uncomplicated malaria (UM) and CM groups, and during follow-up for the CM group (D3, D30). (A) Correlations between CR3 or CD163 expression and non-opsonic phagocytosis of CM's monocytes (NOP-CM). (B) Correlations between LILRB1 or LILRB2 expression and NOP-CM. (C) Correlations between Tim3 expression and NOP-CM, or NOP-UM. (D) Correlation between LILRB1 or LILRB2 expression and opsonic phagocytosis. The significance and strength of the correlation is indicated on each graph by the P and r values.

DISCUSSION

The aim of this study was to assess the functionality of monocytes during CM, based on the hypothesis that CM alters the phagocytosis capacity of monocytes. For this purpose, monocytes from children aged 24 to 71 months and presenting with CM or UM were studied. The children, 19 in each group, were matched on sex and age to avoid bias on these two parameters. Co-infections and non-malarial comas were also ruled out through blood culture and bacterial culture of cerebrospinal fluid (17). In the CM group, only surviving children were included and were followed three and thirty days after inclusion (D3, D30). Furthermore, most of the studies focusing on monocyte functionality were carried out using leukocytes from healthy subjects and lab cultured parasites, with only the antibodies used for opsonization coming from immune patients. Our approach has the advantage of working with patients' monocytes, reflecting the real impact of malaria on the phagocytosis levels of these cells.

We first compared monocyte proportions between CM and UM groups at D0 and during follow-up for the CMs. We found lower proportions of non-classical monocytes in CM group compared to that of UM's at D0. This proportion remained low at D3 and was restored at D30 to a level similar to that of the UM group. Conversely, the proportion of classical monocytes at D0 was higher in the CM group compared to the UM group at D0, and decrease until D30 to a similar level to that of the UM group. These results are very consistent with previous data published by our team, which also showed a lower proportion of non-classical monocytes in CM compared with UM at inclusion, and an association between this lower proportion and the occurrence of death (11). Our results are also supported by those of *Dobbs et al.* who found lower levels of non-classical monocytes in children with UM compared to healthy children of the same age (10). These results suggest that non-classical monocytes are mobilized during malaria at iRBCs sequestration sites, and more specifically in cerebral capillaries in the case of CM. Non-classical monocytes display patrolling properties and are known to be involved in inflammation resolution during non-infectious pathologies (27). We thus postulated that the decrease in the proportion of non-classical monocytes in the bloodstream during acute CM observed here could be due to their recruitment to the inflammatory sites in brain.

Next, to explore the question of monocyte functionality, we assessed the phagocytosis capacity of monocytes from the CM and UM groups. Acute CM was associated with impaired monocyte phagocytosis of iRBCs, when compared to UM. Opsonic, and more particularly non-opsonic phagocytosis, were notably decreased in total monocytes of children presenting with CM at inclusion and 3 days after treatment, compared to their own samples collected 30 days

following treatment. This loss of phagocytic capacity could be explained by the digestion of hemozoin by monocytes. Hemozoin, the end product of hemoglobin digestion by parasites, is known for its immunomodulatory activities, including phagocytosis impairment (28,29). In addition, CD47-SIRP α interactions were shown to negatively regulate macrophage phagocytosis of iRBCs in murine models and anti-CD47 treatment was found to significantly increased clearance of iRBCs (30). Additional studies are needed to determine whether hemozoin activates CD47 mobilization and the consequent inhibition of phagocytosis. In a recent study, *Garcia-Senosian et al.* demonstrated that neutrophils are the main phagocytes of iRBC *in vitro* when compared to monocytes (14). In addition, their study reveals that monocytes are more efficient at non-opsonic phagocytosis than at opsonic phagocytosis, which in line with our results. Indeed, in Figure 2, median percentages of phagocytosis were around 20% for non-opsonic phagocytosis in UM and CM D30, versus 12% for opsonic phagocytosis. Besides, these authors showed that the contribution of monocytes in opsonic phagocytosis of iRBC was related to the degree of antibody opsonization, monocytes gaining the upper hand over neutrophils at lower levels of opsonizing antibodies than at higher plasma dilutions. These results suggest that monocyte response is of high importance in non-immune subjects, such as children under the age of 5 in malaria-endemic areas.

To date, few studies investigated the relationship between each monocyte subset, their phagocytosis potential and association with severity during *Plasmodium* spp. infection. To determine whether the expanded subset is contributing to protection or pathogenesis and potentially be used as a therapeutic target, we investigated each subsets phagocytic capacity of our malaria patients and found that non-classical monocytes exhibit higher phagocytic capacity. In agreement with our results, previous studies have reported similar associations. Focusing on monocytes subsets phagocytosis capacity, *Dobbs et al.* found that intermediate and non-classical monocytes from Kenyan children with acute malaria had greater phagocytic activity than classical monocytes, for both opsonic and non-opsonic phagocytosis (10). However, using whole blood from healthy people co-cultured with opsonized *P. falciparum* lab lines-iRBCs, *Zhou et al.* found that intermediate monocytes had greater *P. falciparum* opsonic phagocytic activity than the other monocytes subsets (13). *Garcia-Senosian et al.* also found a higher capacity of opsonic phagocytosis for intermediate and non-classical monocyte from healthy subjects compared to classical monocytes, with a non-significant superiority of non-classics. Interestingly, their study also showed that classical monocytes were nevertheless the biggest contributors to opsonic phagocytosis, among the 3 sub-populations, due to their much greater absolute numbers than the other two sub-populations (14). We obtained the same

result for both opsonic and non-opsonic phagocytosis in the two clinical groups studied, UM and CM, and in CM this was also true during follow-up at D3 and D30 after inclusion.

Low expression of CD16, CR1, CR3, and Tim3 by total monocytes was related to CM outcome, when compared to UM, and expression of these markers normalized to similar levels to that of UMs upon recovery. For CD16, CR1 and CR3, three receptors implicated in opsonization, such expression profiles are consistent with the lower opsonic phagocytosis capacity of monocytes that we found and suggest an immunosuppressive effect of CM, as *Mandala et al.* concluded in their study (31). However, it is surprising that no difference in CD36 expression, the receptor involved in non-opsonic phagocytosis of iRBC, was obtained in our study. Our team has previously shown a link between lower levels of CD36 protein expression and the occurrence of CM and death (11). However, the expression levels of a gene and its protein can be shifted in time. Interestingly, in our study, CR3 expression was inversely related to non-opsonic phagocytosis capacity of monocytes at D30 in CM children. This result suggests a balance between opsonic and non-opsonic phagocytosis that could be controlled in part by CR3 expression, in the absence or low level of immunity, as in the case of the children in our cohort.

Mandala et al. also studied the surface expression of TLR2 on total monocytes of Malawian children presenting with UM, severe malarial anemia, and CM and upon recovery (4 weeks later). They found a lower expression of TLR2 in the severe malarial anemia and CM groups compared to healthy controls (31). In contrast, *Dobbs et al.* found elevated surface expression of TLR2 on intermediate monocytes from Kenyan children with acute UM compared to healthy children (10). In our study, TLR2 gene expression in monocytes was similar between CM and UM groups, but a profile of increase was observed from D3 to D30 in the CM group, suggesting an inhibition during the first days of CM. TLR2 is known for its interaction with *P. falciparum* glycosylphosphatidylinositol (GPI) and the subsequent activation of inflammatory response (32). Such downregulation could be an actor of the pro- and anti-inflammatory response balance regulation. During the past decade, T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 3 (Tim-3) has been shown to be an important immunomodulatory molecule, as LILRB1 and LILRB2, two receptors interacting with HLA-I molecules to negatively modulate effector immune cells (33,34). It is interesting to note that Tim3 and LILRB2 had opposite gene expression profile by monocytes of the CM group during time. While LILRB2 expression appeared to decrease over time, Tim3 expression increased, suggesting maybe a balance between these two genes in regulating immunosuppressive effect. However, LILRB1, LILRB2 and Tim3 were all found inversely related to non-opsonic

phagocytosis capacity of monocytes in the CM group at D30. The same relation was found for Tim3 expressed by the UM's monocytes. These results do not support our first hypothesis and point instead to inhibitory functions for these 3 receptors in relation to monocyte phagocytosis. Our results also suggest a role for LILRB1 and LILRB2 in the regulation of monocyte opsonic phagocytosis. It would be thus interesting to test whether inhibition of LILRB1 and LILRB2 could help restore the phagocytosis capacity of monocytes.

Although the strength of our study was the characterization of patients' monocytes with a thirty-days follow-up for CM patients, the current study has some limitations. The main limit is the low number of subjects included in this analysis, even though we made sure that the groups were homogenous in terms of age and sex ratio. In addition, the monocytes studied here come from peripheral blood only, monocytes present in the brain being difficult to study for obvious ethical reasons. Despite these limitations, our study provides a better understanding of the interplay between monocytes and malaria infection in the pathogenicity of CM.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data and materials analyzed in the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

Ethics approval for the NeuroCM study was obtained from the Comité National d'Ethique pour la Recherche en santé of Benin (n°67/ MS/DC/SGM/DRFMT/CNERS/SA; 10/17/2017). The study has also been approved by the Comité consultatif de déontologie et d'éthique of Institut de Recherche pour le Développement (IRD; 10/24/2017). Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BV designed and conducted experiments with the help of SD, under AA and AY supervision. BV, JR, GIB participated to the sample collection. JFF supervised patient's recruitment and clinical analysis with SH. AA designed the research study, supervised the field study and the lab experiments. BV and AA drafted the first version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-17-CE17-0001), including a PhD grant for Jade Royo. Bertin Vianou received a PHD grant called Research grant for a thesis in the South (ARTS) from the Institut de Recherche pour le Developpement France (IRD).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all children and their parents for participating in this study. We are thankful to the nurses and health workers of the CHU-MEL hospital (CHU Mere et Enfant de la Lagune) and Hopital de zone de Calavi (CHU-ZAS) for their help in the inclusion of patients and collection of samples. We thank all the members of the NeuroCM group for their contribution to the project. Finally, many thanks to the team of the cytometry technical platform (Ranguel Hospital, Toulouse, France), and particularly Alexia Zakaroff-Girard and Elodie Riant for their excellent skills and their great and kind help in flow cytometry.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at:

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization. World malaria Report. (2023). (Geneva: WHO). Available at: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023> (Accessed December 18, 2023).
2. Schiess N, Villabona-Rueda A, Cottier KE, Huether K, Chipeta J, Stins MF. Pathophysiology and neurologic sequelae of cerebral malaria. *Malar J* (2020) 19:266. doi: 10.1186/s12936-020-03336-z
3. Breman JG. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* (2001) 64:1–11. doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.1
4. Chaudhary A, Kataria P, Surela N, Das J. Pathophysiology of cerebral malaria: implications of MSCs as a regenerative medicinal tool. *Bioengineering* (2022) 9:263. doi: 10.3390/bioengineering9060263
5. Royo J, Camara A, Bertrand B, Batigne P, Coste A, Pipy B, et al. Kinetics of monocyte subpopulations during experimental cerebral malaria and its resolution in a model of late chloroquine treatment. *Front Cell Infect Microbiol* (2022) 12:952993. doi: 10.3389/fcimb.2022.952993
6. Dobbs KR, Crabtree JN, Dent AE. Innate immunity to malaria, the Role of monocytes. *Immunol Rev* (2020) 293:8–24. doi: 10.1111/imr.12830
7. Christensen JJ, Osnes LT, Halvorsen B, Retterstøl K, Bogsrud MP, Wium C, et al. Altered leukocyte distribution under hypercholesterolemia: A cross-sectional study in children with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* (2017) 256:67–74. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.031
8. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TPJ. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol* (2013) 4:23. doi: 10.3389/fimmu.2013.00023
9. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* (2010) 116:e74–80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558
10. Dobbs KR, Embury P, Vulule J, Odada PS, Rosa BA, Mitreva M, et al. Monocyte dysregulation and systemic inflammation during pediatric falciparum malaria. *JCI Insight* (2017) 2:e95352, 95352. doi: 10.1172/jci.insight.95352
11. Royo J, Rahabi M, Kamaliddin C, Ezinmagnon S, Olgagnier D, Authier H, et al. Changes in monocyte subsets are associated with clinical outcomes in severe malarial anaemia and cerebral malaria. *Sci Rep* (2019) 9:17545. doi: 10.1038/s41598-019-52579-7
12. Antonelli LRV, Leoratti FMS, Costa PAC, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, et al. The CD14+CD16+ inflammatory monocyte subset displays increased mitochondrial activity and effector function during acute Plasmodium vivax malaria. *PLoS Pathog* (2014) 10:e1004393. doi: 10.1371/journal.ppat.1004393

13. Zhou J, Feng G, Beeson J, Hogarth PM, Rogerson SJ, Yan Y, et al. CD14(hi)CD16+ monocytes phagocytose antibody-opsonised Plasmodium falciparum infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Med* (2015) 13:154. doi: 10.1186/s12916-015-0391-7
14. Garcia-Senosian A, Kana IH, Singh S, Das MK, Dziegiel MH, Hertegonne S, et al. Neutrophils dominate in opsonic phagocytosis of P. falciparum blood-stage merozoites and protect against febrile malaria. *Commun Biol* (2021) 4:984. doi: 10.1038/s42003-021-02511-5
15. Joste V, Maurice L, Bertin GI, Aubouy A, Boumédiène F, Houzé S, et al. Identification of Plasmodium falciparum and host factors associated with cerebral malaria: description of the protocol for a prospective, case-control study in Benin (NeuroCM). *BMJ Open* (2019) 9:e027378. doi: 10.1136/bmjopen-2018-027378
16. World Health Organization. Management of severe malaria, a practical handbook, third edition. (2019). (Geneva: WHO). Available at: <https://www.who.int/publications/item/9789241548526> (Accessed December 18, 2023).
17. Royo J, Vianou B, Accrombessi M, Kinkpé E, Ayédadjou L, Dossou-Dagba I, et al. Elevated plasma interleukin-8 as a risk factor for mortality in children presenting with cerebral malaria. *Infectious Diseases of Poverty* (2023) 12:8. doi: 10.1186/s40249-023-01059-2
18. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annual Review of Immunology* (2001) 19:275–290. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.275
19. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:34–47. doi: 10.1038/nri2206
20. Walbaum S, Ambrosy B, Schütz P, Bachg AC, Horsthemke M, Leusen JHW, et al. Complement receptor 3 mediates both sinking phagocytosis and phagocytic cup formation via distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* (2021) 296: doi: 10.1016/j.jbc.2021.100256
21. Fernandez-Arias C, Lopez JP, Hernandez-Perez JN, Bautista-Ojeda MD, Branch O, Rodriguez A. Malaria inhibits surface expression of complement receptor 1 in monocytes/macrophages, causing decreased immune complex internalization. *J Immunol* (2013) 190:3363–3372. doi: 10.4049/jimmunol.1103812
22. Cao H, Antonopoulos A, Henderson S, Wassall H, Brewin J, Masson A, et al. Red blood cell mannoses as phagocytic ligands mediating both sickle cell anaemia and malaria resistance. *Nat Commun* (2021) 12:1792. doi: 10.1038/s41467-021-21814-z
23. Erdman LK, Cosio G, Helmers AJ, Gowda DC, Grinstein S, Kain KC. CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol* (2009) 183:6452–6459. doi: 10.4049/jimmunol.0901374
24. Sakoguchi A, Saito F, Hirayasu K, Shida K, Matsuoka S, Itagaki S, et al. Plasmodium falciparum RIFIN is a novel ligand for inhibitory immune receptor LILRB2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2021) 548:167–173. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.02.033

25. Dechavanne C, Nouatin O, Adamou R, Edslev S, Hansen A, Meurisse F, et al. Placental Malaria is Associated with Higher LILRB2 Expression in Monocyte Subsets and Lower Anti-Malarial IgG Antibodies During Infancy. *Front Immunol* (2022) 13:909831. doi: 10.3389/fimmu.2022.909831
26. Saito F, Hirayasu K, Satoh T, Wang CW, Lusingu J, Arimori T, et al. Immune evasion of *Plasmodium falciparum* by RIFIN via inhibitory receptors. *Nature* (2017) 552:101–105. doi: 10.1038/nature24994
27. Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska AM, Moniuszko M. The role of different monocyte subsets in the pathogenesis of atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Scandinavian Journal of Immunology* (2015) 82:163–173. doi: 10.1111/sji.12314
28. Tyberghein A, Deroost K, Schwarzer E, Arese P, Van den Steen PE. Immunopathological effects of malaria pigment or hemozoin and other crystals. *Biofactors* (2014) 40:59–78. doi: 10.1002/biof.1119
29. Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, Giribaldi G, Ginsburg H, Arese P. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* (1992) 176:1033–1041. doi: 10.1084/jem.176.4.1033
30. Torrez Dulgeroff LB, Oakley MS, Tal MC, Yiu YY, He JQ, Shoham M, et al. CD47 blockade reduces the pathologic features of experimental cerebral malaria and promotes survival of hosts with *Plasmodium* infection. *Proc Natl Acad Sci USA* (2021) 118:e1907653118. doi: 10.1073/pnas.1907653118
31. Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Drayson MT, Molyneux ME, MacLennan CA. Monocyte activation and cytokine production in Malawian children presenting with *P. falciparum* malaria. *Parasite Immunol* (2016) 38:317–325. doi: 10.1111/pim.12319
32. Kumar S, Gowda NM, Wu X, Gowda RN, Gowda DC. CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells. *Parasite Immunol* (2012) 34:372–382. doi: 10.1111/j.1365-3024.2012.01367.x
33. Hirayasu K, Arase H. Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. *J Hum Genet* (2015) 60:703–708. doi: 10.1038/jhg.2015.64
34. Kang X, Kim J, Deng M, John S, Chen H, Wu G, et al. Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle* (2016) 15:25–40. doi: 10.1080/15384101.2015.1121324

NeuroCM group members

Dissou Affolabi (Pediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin);
Daniel Ajzenberg (UMR EpiMaCT, INSERM, Limoges University, France);
Nicolas Argy (UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France)
Bibiane Biokou (Medical laboratory, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin);
Maroufou Jules Alao (Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin);
Linda Ayedadjou (Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin);
Farid Boumediene (UMR EpiMaCT, INSERM, Limoges University, Limoges, France);
Josselin Brisset (Infectious diseases and tropical medicine department, Limoges University Hospital, Limoges, France);
Michel Cot (UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France);
Jean-Eudes Degbelo (Medical laboratory, Calavi Hospital, Calavi, Benin);
Philippe Deloron UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France);
Ida Dossou-Dagba (Pediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin)
Latifou Dramane (Institut de Recherche Clinique du Benin (IRCB), Calavi, Benin);
Emilie Guillochon (UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France)
Sayeh Jafari-Guemouri (UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France)
Valentin Joste (UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France)
Claire Kamaliddin (UMR 261 MERIT, Sorbonne Paris Cité University, IRD, Paris, 75006, France);
Elisée Kinkpé (Paediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin);
Anais Labrunie (UMR EpiMaCT, INSERM, Limoges University, Limoges, France);
Yélé Ladipo (Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin);
Thomas Lathiere (Ophtalmology department, Limoges University Hospital, Limoges, France);
Achille Massougbodji (Institut de Recherche Clinique du Benin (IRCB), Calavi, Benin);
Audrey Mowendabeka (Paediatric Department, Mother and Child Hospital, Limoges, France);
Jade Papin (UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France);
Bernard Pipy (UMR RESTORE, Toulouse 3 University, INSERM, CNRS, EFS, UPS, 31100 Toulouse, France);
Pierre-Marie Preux (UMR EpiMaCT, INSERM, IRD, Limoges University, Limoges, France);
Marie Raymondeau (UMR EpiMaCT, INSERM, Limoges University, Limoges, France);
Darius Sossou (UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France);
Brigitte Techer UMR261 MERIT, Université Paris Cité, IRD, F-75006 Paris, France;
Laurence Watier (Center for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), INSERM U1018, Paris-Saclay University, Montigny-Le-Bretonneux, France).

III- Identification des marqueurs plasmatiques et urinaires du risque de neuropaludisme et de décès

1. Introduction

Bien que la séquestration parasitaire dans la microvasculature soit au cœur de la pathogenèse du neuropaludisme, elle ne peut à elle seule expliquer la neuroinflammation. Il est évident que les facteurs immunitaires de l'hôte jouent un rôle important dans la pathogenèse du neuropaludisme. L'équilibre entre les cytokines et les chimiokines spécifiques produites en réponse à l'infection par *P. falciparum* jouerait un rôle important dans la modulation des réponses immunitaires de l'hôte vis-à-vis de nombreuses maladies infectieuses et inflammatoires, dont le paludisme. Cependant, une production exacerbée de cytokines, chimiokines et autres acteurs de la réponse inflammatoire et oxydative par les cellules T, les monocytes et les cellules NK peut également contribuer à la pathogenèse du neuropaludisme. Dans cette dernière partie de la thèse, dans le but d'identifier des biomarqueurs prédictifs de décès ou de survie au cours du neuropaludisme, des biomarqueurs plasmatiques et urinaires ont été mesurés chez les enfants souffrant d'un neuropaludisme (enfants décédés du neuropaludisme et ceux ayant survécu).

Les résultats de l'identification des marqueurs plasmatiques et urinaires du risque de neuropaludisme et de décès sont présentés sous forme d'article en anglais, dont voici le résumé en français :

2. Elevated plasma interleukin-8 as a risk factor for mortality in children presenting with cerebral malaria

2.1. Résumé

Contexte : Le neuropaludisme est une neuropathologie qui reste l'une des formes de paludisme les plus mortelles chez les enfants africains. La cinétique des mécanismes physiopathologiques conduisant à la neuroinflammation et à la mort ou à la survie des patients au cours du neuropaludisme sont encore mal comprises. La production croissante de cytokines, chimiokines et autres acteurs de la réponse inflammatoire et oxydative par différents acteurs locaux en réponse à la neuroinflammation joue un rôle majeur au cours du neuropaludisme, participant à la fois à l'amplification du phénomène de neuroinflammation et à sa résolution. Dans cette étude, nous avons pour objectif d'identifier les facteurs de risque de décès par neuropaludisme parmi des variables spécifiques des réponses inflammatoires et oxydatives afin d'améliorer notre compréhension de la pathogenèse du neuropaludisme.

Méthodes : Les enfants présentant un neuropaludisme (n = 70) due à une infection à *P. falciparum* ont été inclus dans le sud du Bénin et répartis selon l'issue clinique de la maladie en 50 enfants ayant survécu et 20 enfants décédés. L'examen clinique a été complété par un examen fondoscopique et une analyse biochimique sanguine approfondie associée à un diagnostic moléculaire par PCR multiplex ciblant 14 pathogènes présents dans le liquide céphalo-rachidien des patients pour exclure les co-infections. La technologie Luminex et des kits de dosage immunoenzymatique ont été utilisés pour mesurer respectivement 17 biomarqueurs plasmatiques et 7 biomarqueurs urinaires. Les données ont été analysées par analyse univariée à l'aide du test non paramétrique Mann-Whitney U et du test Chi² de Pearson. Des analyses multivariées et ajustées ont été menées séparément pour les biomarqueurs plasmatiques et urinaires afin d'identifier les facteurs de risque de décès par neuropaludisme.

Résultats : L'analyse univariée a révélé des taux plasmatiques élevés de facteur de nécrose tumorale (TNF), d'interleukine-1bêta (IL-1 β), d'IL-10, d'IL-8, de ligand de chimiokine 9 du motif CXC (CXCL9), de granzyme B et d'angiopoïétine-2 et des taux urinaires inférieurs de métabolite de la prostaglandine E2 (PGEM) chez les enfants décédés par rapport à ceux qui ont survécu au neuropaludisme (test U de Mann-Whitney, valeurs P comprises entre 0,03 et < 0,0001). L'analyse logistique multivariée a mis en évidence des taux plasmatiques élevés d'IL-8 comme principal facteur de risque de décès au cours du neuropaludisme (adjusted odd ratio = 14,2 ; P = 0,002). Les valeurs obtenues lors du suivi à J3 et J30 ont révélé des facteurs immunitaires associés à la résolution de la maladie, notamment le CXCL5 plasmatique, le ligand 17 de la chimiokine du motif CC (CCL17), le CCL22 et le 15-F2t-isoprostane urinaire.

Conclusions : Le principal facteur de risque de décès au cours du neuropaludisme était donc des taux plasmatiques élevés d'IL-8 à l'inclusion. Le suivi des patients jusqu'à J30 a révélé des profils de marqueurs d'aggravation et de résolution de la maladie pour les marqueurs impliqués dans l'activation des neutrophiles, l'activation et les lésions de l'endothélium, la réponse inflammatoire et oxydative. Ces résultats fournissent des informations importantes sur notre compréhension de la pathogenèse et des issues cliniques du neuropaludisme et peuvent avoir des implications thérapeutiques importantes.


Mots-clés : Neuropaludisme; Enfants; Bénin; Cytokines; Plasma; Urine; Marqueur immunologique; NeuroCM

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Elevated plasma interleukin-8 as a risk factor for mortality in children presenting with cerebral malaria

Jade Royo^{1†}, Bertin Vianou^{1,2†}, Manfred Accrombessi^{2,3}, Eliséé Kinkpé⁴, Linda Ayédadjou⁵, Ida Dossou-Dagba⁴, Yélé Ladipo⁵, Maroufou Jules Alao⁵, Gwladys I. Bertin⁶, Michel Cot⁶, Farid Boumédiène⁷, Sandrine Houzé^{6,8,9}, Jean François Faucher^{7,10}, Agnès Aubouy^{1,2*}  and NeuroCM Group

Abstract

Background Cerebral malaria (CM) is a neuropathology which remains one of the deadliest forms of malaria among African children. The kinetics of the pathophysiological mechanisms leading to neuroinflammation and the death or survival of patients during CM are still poorly understood. The increasing production of cytokines, chemokines and other actors of the inflammatory and oxidative response by various local actors in response to neuroinflammation plays a major role during CM, participating in both the amplification of the neuroinflammation phenomenon and its resolution. In this study, we aimed to identify risk factors for CM death among specific variables of inflammatory and oxidative responses to improve our understanding of CM pathogenesis.

Methods Children presenting with CM ($n = 70$) due to *P. falciparum* infection were included in southern Benin and divided according to the clinical outcome into 50 children who survived and 20 who died. Clinical examination was complemented by fundoscopic examination and extensive blood biochemical analysis associated with molecular diagnosis by multiplex PCR targeting 14 pathogens in the patients' cerebrospinal fluid to rule out coinfections. Luminex technology and enzyme immunoassay kits were used to measure 17 plasma and 7 urinary biomarker levels, respectively. Data were analysed by univariate analysis using the nonparametric Mann–Whitney *U* test and Pearson's Chi2 test. Adjusted and multivariate analyses were conducted separately for plasma and urinary biomarkers to identify CM mortality risk factors.

Results Univariate analysis revealed higher plasma levels of tumour necrosis factor (TNF), interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-10, IL-8, C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9), granzyme B, and angiopoietin-2 and lower urinary levels of prostaglandin E2 metabolite (PGEM) in children who died compared to those who survived CM (Mann–Whitney *U*-test, *P*-values between 0.03 and < 0.0001). The multivariate logistic analysis highlighted elevated plasma levels of IL-8 as the main risk factor for death during CM (adjusted odd ratio = 14.2, *P*-value = 0.002). Values obtained during follow-up at D3 and D30 revealed immune factors associated with disease resolution, including plasma CXCL5, C–C motif chemokine ligand 17 (CCL17), CCL22, and urinary 15-F2t-isoprostane.

[†]Jade Royo and Bertin Vianou contributed equally to this work.

*Correspondence:

Agnès Aubouy
agnes.aubouy@ird.fr

Full list of author information is available at the end of the article



Conclusions The main risk factor of death during CM was thus elevated plasma levels of IL-8 at inclusion. Follow-up of patients until D30 revealed marker profiles of disease aggravation and resolution for markers implicated in neutrophil activation, endothelium activation and damage, inflammatory and oxidative response. These results provide important insight into our understanding of CM pathogenesis and clinical outcome and may have important therapeutic implications.

Keywords Cerebral malaria, Children, Benin, Cytokine, Plasma, Urine, Immunologic marker, NeuroCM

Background

According to the latest World Health Organization global report, 247 million cases of malaria were reported worldwide in 2021, leading to an estimated 619,000 deaths, 80% of which were in children under 5 years of age in sub-Saharan Africa [1]. Cerebral malaria (CM) is the most severe form of malaria and can lead even when treated to neurological sequelae in 4–10% of cases and death of patients [2]. CM is defined by the presence of the asexual form of *Plasmodium falciparum* parasite associated with a Blantyre score ≤ 2 , coma that persists for > 1 h after a seizure, regardless of anticonvulsant medications, and exclusion of any other cause of coma [3]. Today, in endemic countries, the diagnosis of CM is still difficult. A coma in the presence of *P. falciparum* parasites in the peripheral blood is often considered as CM, leading to an overestimation of approximately 25% of CM cases [4]. An accurate differential diagnosis combining fundoscopic examination [5], blood biochemical analysis, and molecular diagnosis of microbial infections would therefore constitute a considerable advance for a diagnosis better adapted to the infectious risks of the area.

The kinetics of the pathophysiological mechanisms leading to the development of CM are still poorly understood. However, infected red blood cells (iRBCs) are known to be sequestered in cerebral blood vessels through cytoadherence to the brain endothelium via parasitic ligands and endothelial receptors such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and endothelial protein C receptor (EPCR) [6, 7]. This interaction, along with toxin production, leads to the activation of endothelial cells [8]. The latter will then secrete cytokines and chemokines leading to the recruitment of platelets and immune cells to the brain, such as monocytes, lymphocytes and neutrophils [9]. A local inflammatory process is being set [10], with a positive feedback mechanism that leads to the obstruction of cerebral blood flow, increased intracranial pressure, hypoxia and impairment of the integrity of the blood–brain barrier (BBB).

In this context, the increasing production of cytokines, chemokines and other actors of the inflammatory and oxidative response by various local actors in response to neuroinflammation plays a major role during CM, participating in both the amplification of

the neuroinflammation phenomenon and its resolution [9, 11, 12]. Cytokines are membrane or secreted glycoproteins with proinflammatory or anti-inflammatory properties that modulate the local microenvironment. Chemokines are small cytokines capable of activating and recruiting immune cells to the site they are produced and are specifically involved in the recruitment of monocytes/lymphocytes, regulatory lymphocytes and neutrophils [13]. The importance of pro- and anti-inflammatory responses in the pathophysiology of CM has been discussed many times in the literature (reviewed in [14]). If the production of proinflammatory cytokines and chemokines is necessary for the elimination of iRBCs and to achieve an effective immune response, its excessive and uncontrolled development is thought to result in aggravation of neuroinflammation. The resolution of the infection therefore requires a fine adjustment of the kinetics of the production of cytokines, chemokines and other immune markers, although such a strategy still needs to be defined.

The metabolism of arachidonic acid, an unsaturated $\omega 6$ fatty acid constituent of the phospholipids of cell membranes, also produces relevant markers of the inflammatory and oxidant responses involved in various non-infectious and infectious diseases [15–18]. Arachidonic acid is metabolized to prostaglandins (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGI₂) and thromboxanes by COX1 and COX2 enzymes, to leukotrienes (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) and lipoxins (LXA₄, LXB₄) by lipoxygenases and to epoxyeicosatrienoic acids via cytochrome p450-catalysed metabolism. Arachidonic acid also produces isoprostanes through nonenzymatic oxidative processes involving free reactive oxygen species (ROS), thereby illustrating a prooxidant environment. Glutathione, involved in leukotrienes and prostaglandins metabolism, is an important actor of the antioxidant response, the reduced glutathione/oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) allowing the evaluation of oxidative stress status. GSH levels were previously shown to be lower in uncomplicated malaria (UM) Ugandan patients compared to healthy controls and decreased in brains from mice presenting experimental CM [19, 20]. Experimental cerebral malaria (ECM) studies have demonstrated the importance of the 5-LOX/LXA₄ axis in limiting the

proinflammatory and prooxidant response and promoting disease resolution [21, 22]. In humans, it has already been shown that urine PGE2 and COX2 expression are inversely related to disease severity in children, including CM children [23, 24]. Arachidonic acid metabolites are easily measured in urine. We therefore opted for this type of assay, as urine sampling has the advantage of being non-invasive, to provide additional data on these markers of oxidative and inflammatory responses.

We previously demonstrated that predictors of early death in CM are increased bilirubin and lactate, while antibiotic use before admission and vaccination against yellow fever were protective factors [25]. Here, we studied more specific variables of inflammatory and oxidative responses to identify risk factors for CM death to improve our understanding of CM pathogenesis. The added value of our study lies in the quality of the diagnosis used to select subjects with CM that allowed us to rule out non-malarial comas and coinfections associating *P. falciparum* with a bacterial or viral infection. In addition, for patients who survived, the variables were measured 3 and 30 days (D3, D30) after inclusion in the study. Univariate analysis revealed that higher plasma levels of tumour necrosis factor (TNF), interleukin-1beta (IL-1 β), IL-10, IL-8, C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9), granulocyte B, and angiopoietin-2 and lower urinary levels of PGEM were associated with mortality in CM patients. In a second step, the multivariate logistic regression underlined the strong association between higher plasma IL-8 levels and death outcome during CM. Values obtained during follow-up at D3 and D30 revealed more particularly immune factors associated with disease resolution, including plasma CXCL5, C-C motif chemokine ligand 17 (CCL17), CCL22, and urinary 15-F2t-isoprostane.

Methods

Study design and participants

This prospective study was part of the NeuroCM project whose protocol was previously described [26]. Briefly, patients were included from March to December 2018 in two reference hospitals from southern Benin, the Centre Hospitalier Universitaire de la Mère et de l'Enfant Lagune (CHU-MEL) in Cotonou, and the "Centre Hospitalier Universitaire de Zone d'Abomey Calavi/Sô-Ava" (CHU-ZAS) in Abomey-Calavi, located 25 km north of Cotonou. Children included in this study were aged between 2 and 6 years old and suffered from CM defined by deep coma (Blantyre score < 2) with *P. falciparum* infection and no other known cause of coma (e.g., acute bacterial meningitis, coma related to hypoglycaemia reversed by glucose infusion, status epilepticus, pre-existing neurological disease, traumatic or toxic coma). A negative HIV

rapid diagnostic test and parental informed consent were also required for children to participate in the study.

Clinical examination, blood sampling and child follow-up

Once consent was obtained, a thorough clinical examination was carried out, and venous blood samples were collected for research, haematologic and biochemistry analyses (ethylene diamine tetraacetic acid and heparin tubes), and blood culture (BD Bactec™ bottle, Becton Dickinson France). Blood samples were stored at 4 °C and then transferred within 4 h to the appropriate laboratory (medical or research laboratory). A lumbar puncture was performed as soon as possible if the patient was sufficiently clinically stable. Part of the sample was transferred to the medical analysis laboratory for culture, and part was stored at - 80 °C for subsequent pathogen testing. Patient urine was also collected during the day of inclusion (D0) and stored at - 80 °C as soon as possible. Urine was stored in 0.005% butylated hydroxytoluene to avoid oxidation. Finally, a fundoscopic examination (Eye-pax 1.0 Dioptrix) was carried out on D1 to identify the retinopathies generally observed during CM and whose severity reflects the neurological sequelae [3]. The children were monitored clinically every day for the duration of their hospitalization. A thorough clinical examination was performed on the day of discharge from the hospital and 30 days after inclusion (D30). At D3 and D30, venous blood samples and urine were collected again, stored, and transferred as before.

Confirmation of *P. falciparum* infection and absence of coinfection

At inclusion, *P. falciparum* infection was confirmed by thick and thin blood smear Giemsa staining and parasite quantification. Parasitemia was calculated for each patient based on their total leukocyte count. In cases of conflicting results between the rapid test and blood smear, *P. falciparum* infection was confirmed by PCR, as described below.

To rule out coinfections, blood culture, Gram staining, and bacterial culture of cerebrospinal fluid were performed at the university hospital reference laboratory (Centre National Hospitalier Universitaire, Cotonou). Cerebrospinal fluid was also tested for the presence of meningitis or encephalopathy by multiplex PCR targeting 14 pathogens (*Escherichia coli* K1, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae*, cytomegalovirus, enterovirus, herpes simplex virus 1 and 2, human herpes virus 6, human parechovirus, varicella-zona virus, *Cryptococcus neoformans/gattii*) using the Meningitis/Encephalitis FilmArray® panel (Biomérieux, Craponne, France). In addition, dengue virus, Chikungunya virus,

West Nile virus, *Plasmodium* spp., *Rickettsia* spp., *Leptospira* spp., *Salmonella* spp. (FTD Tropical Fever core PCR, Fast Track Diagnostics, Luxembourg) and *Plasmodium* species (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* and *P. vivax*—FTD Malaria differentiation, Fast Track Diagnostics, Luxembourg) and IgM measles (Measles IgM Capture EIA, Clin-Tech Limited, UK) were retrospectively performed on the blood samples.

Urinary biomarkers

Urinary concentrations of 15-F2t-isoprostane, leukotriene B4 (LTB4), lipoxine A4 (LXA4), the metabolites of prostanglandine E2 metabolite (PGEM), reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG) and creatinine were measured using commercial enzyme immunoassays kits (Oxford Biomedical Research for 15-F2t-isoprostane, LTB4, LXA4 and PGEM, Cayman Chemical for GSH/GSSG, BioVision for creatinine) for CM patients at D0, D3 and D30, according to the manufacturer's protocol. As recommended by the manufacturer, the samples were pre-treated with β -glucuronidase for 15-F2t-isoprostane dosage to separate isoprostane from glucuronic acid, with this complexed form representing more than 50% of the isoprostane present in the urine [27]. Similarly, prior to PGEM dosage, for reasons of PEG2 instability, standards and urine samples were subjected to derivatization to quantify a stable derivative. Finally, for the measurement of oxidized glutathione (GSSG), standards and samples were pretreated with 2-vinylpyridine to derivatize GSH. A second assay in the absence of pretreatment was carried out to determine the concentration of total GSH and the subsequent amount of reduced glutathione (GSH) equal to total GSH–GSSG. The plate reader TECAN Infinite F200 pro and dedicated software were used for plate readings. Values of the different urinary biomarkers were normalized to the urinary creatinine concentrations for each patient.

Plasma biomarkers

Using Luminex technology, plasma levels of 17 markers of pro- and anti-inflammatory responses were simultaneously measured. The Human Premixed Multi-Analyte Kit (LXSAHM-17, R&D Systems, Lille, France) was used according to the manufacturer's recommendation by the Anexplo platform (Genotoul, Toulouse, France). The plasma concentration of soluble EPCR was determined by ELISA according to the manufacturer's recommendations (DuoSet® R&D Systems).

Statistical analysis

The main outcome of the study was malaria mortality among CM children, whereas plasmatic and urinary biomarkers were the first explanatory variables. The

following variables were used for adjusting the different analyses: sociodemographic variables (age, sex), clinical variables (presence of hepatomegaly, splenomegaly, underweight, Blantyre score, history of vaccination, antibiotic use), and biological variables (blood smear, haemoglobin level, blood count, glycaemia, renal markers).

We described the general characteristics of children with CM and distinguished those who died or survived. For descriptive analysis, quantitative variables were presented as the means \pm standard deviations or medians interquartile ranges, and qualitative variables were presented as frequencies (percentages). The variations in biomarkers between CM children who died and those who survived were assessed by using the nonparametric Mann–Whitney U test for quantitative variables and the Pearson's Chi2 test for qualitative variables.

We used the median for defining the thresholds to transform biomarkers into binary variables. Logistic regression models were performed to identify sociodemographic, clinical, biological and immunological biomarkers associated with malaria severity and mortality. Variables with a *P*-value < 0.20 in univariate analysis based on Fischer's exact test were included in the multivariable analyses.

We conducted adjusted analyses separately for urinary and plasmatic biomarkers. For both biomarkers, multivariate analyses were performed in two steps. First, we identified demographic, clinical and biological variables that were significantly related to the study outcomes, and then we assessed urinary and plasmatic biomarkers that were also significantly associated with malaria mortality to take into account the interaction between biomarkers when appropriate. These statistically significant biomarkers from the multivariate analyses were adjusted for demographic, clinical and biological variables.

A manual backwards selection procedure was performed, and statistical significance was set at *P*-value < 0.05. All analyses were conducted using Stata 16.0 Software for Windows (Stata Corp, College Station, TX, USA).

Results

Sociodemographic and clinical characteristics of the study children

Initially, 78 children diagnosed with CM (deep coma and *P. falciparum* infection) were included in the NeuroCM study. Further analysis revealed 8 coinfections combining *falciparum* malaria with viral or bacterial infection, as previously described [25]. In this study, the 70 subjects with CM due to *P. falciparum* infection only were analysed and divided according to the clinical outcome into 50 children who survived and 20 who died (Fig. 1). The baseline characteristics of these patients were described

and compared according to the group (Table 1). A majority of girls were enrolled (58.6% versus 41.4%), but sex had no incidence on disease outcome. The mean age was 45.04 (± 12.1) months. Children belonged mostly to the Fon ethnic group, the majority ethnic group in southern Benin. Among the sociodemographic and clinical factors studied here, five clinical features were associated with mortality, as shown in Table 1: no previous antibiotic treatment ($P=0.02$), a lower Blantyre score ($P=0.03$), symptoms of splenomegaly ($P=0.03$ for both), jaundice ($P=0.004$) and hyperlactatemia ($P=0.007$).

Parasitological, haematological and biochemical characteristics of the study population

The children enrolled were characterized by high parasitemia with a median parasitemia of 74,800/μl of blood and a low haemoglobin level with a mean of 58 (± 22) g/L (Table 2). Both variables had no effect on disease

outcome. Among the biological factors studied, the number of leucocytes, and more particularly lymphocytes and monocytes, was higher in the group of deceased children (Table 2, $P=0.04$, 0.01 and 0.004, respectively). For biochemistry factors, higher creatinine levels were associated with death (Table 2, $P=0.02$).

Higher IL-8 levels are strongly associated with cerebral malaria death

To identify specific risk factors for CM mortality among the mediators of the cellular immune response, we then analysed the relationship between clinical outcome and 24 immune parameters, including 17 plasma and 7 urinary factors. Figures 2 and 3 present the univariate analysis using Mann–Whitney U tests for plasma and urinary parameters. The results showed that plasma levels of the proinflammatory cytokines TNF, IL-8, and IL-1β and the anti-inflammatory

Table 1 Sociodemographic characteristics of the NeuroCM study population, care pathway and clinical data at inclusion

Factors	Overall <i>n</i> = 70	Surviving children <i>n</i> = 50	Deceased children <i>n</i> = 20	<i>P</i> -value ^a
Female sex, <i>n/n</i> total (%)	41/70 (58.6)	31/50 (62.0)	10/20 (50.0)	0.36
Male sex, <i>n/n</i> total (%)	29/70 (41.4)	19/50 (38.0)	10/20 (50.0)	
Age in months, mean (± <i>SD</i>)	45.0 (± 12.1)	44.7 (± 12.1)	45.8 (± 12.3)	0.81
Ethnic group, <i>n/n</i> total (%)				
Adja	7/68 (10.3)	6/49 (12.2)	1/19 (5.3)	0.39
Aizo	8/68 (11.8)	8/49 (16.3)	0	0.06
Dendi	1/68 (1.5)	0	1/19 (5.3)	0.10
Fon	34/68 (50.0)	21/49 (42.9)	13/19 (68.4)	0.06
Goun	4/68 (5.9)	3/49 (6.1)	1/19 (5.3)	0.89
Weme	1/68 (1.5)	1/49 (2.0)	0	0.53
Xwla	2/68 (2.9)	1/49 (2.0)	1/19 (5.3)	0.48
Yoruba	2/68 (2.9)	2/49 (4.1)	0	0.37
Other	9/68 (13.2)	7/49 (14.3)	2/19 (10.5)	0.68
Undernet use, <i>n/n</i> total (%)	62/69 (89.9)	44/49 (89.8)	18/20 (90.0)	0.98
Antibiotics use, <i>n/n</i> total (%)	20/70 (28.6)	18/50 (36.0)	2/20 (10.0)	0.02
No measles vaccination, <i>n/n</i> total (%)	14/67 (20.9)	9/48 (18.7)	5/19 (26.3)	0.49
No yellow fever vaccination, <i>n/n</i> total (%)	18/67 (26.9)	11/48 (22.9)	7/19 (36.8)	0.25
Weight in kg, mean (± <i>SD</i>)	12.6 (± 2.4)	12.6 (± 2.5)	12.5 (± 2.4)	0.86
°C axillary temperature, mean (± <i>SD</i>)	38.3 (± 1.1)	38.4 (± 1.1)	38.0 (± 1.0)	0.21
Pulse /min, mean (± <i>SD</i>)	150.6 (± 21.0)	151.6 (± 20.6)	148.1 (± 22.6)	0.46
Blantyre score, mean (± <i>SD</i>)	1.7 (± 0.5)	1.8 (± 0.4)	1.4 (± 0.6)	0.03
Abnormal eyes fund, <i>n/n</i> total (%)	36/55 (65.5)	33/50 (66.0)	3/5 (60.0)	0.79
Hepatomegaly, <i>n/n</i> total (%)	37/70 (52.9)	26/50 (52.0)	11/20 (55.0)	0.82
Splenomegaly, <i>n/n</i> total (%)	25/70 (35.7)	14/50 (28.0)	11/20 (55.0)	0.03
Jaundice ^b , <i>n/n</i> total (%)	33/69 (47.9)	18/49 (36.7)	15/20 (75.0)	0.004
Hyperlactatemia ^c , <i>n/n</i> total (%)	42/70 (60.0)	25/50 (50.0)	17/20 (85.0)	0.007

^a Mann–Whitney U test for quantitative variables, Pearson's *Chi*² test for qualitative variables

P-values in bold are < 0.05

^b Clinical jaundice or total bilirubin > 29.2 mg/L (50 μmol/L)

^c Hyperlactatemia means lactate > 5 mmol/L

Table 2 Parasitological, haematological and biochemistry characteristics of the NeuroCM study population

Factors	Overall n = 70	Surviving children n = 50	Deceased children n = 20	P-value ^a
<i>P. falciparum</i> density /μl of blood, median (IQR)	74,800 (12,425–421,278)	45,000 (4940–317,250)	296,000 (32,590–684,190)	0.09
Haemoglobin level in g/dL, mean (± SD)	5.8 (± 2.2)	5.9 (± 2.1)	5.7 (± 2.6)	0.71
Haemoglobin level < 11, % (n)	97.1 (68)	98.0 (49)	95.0 (19)	0.55
Hematocrit, mean (± SD)	17.1 (± 6.9)	17.4 (± 6.4)	16.6 (± 8.0)	0.42
Leucocytes × 10 ³ /μl, mean (± SD)	16.8 (± 11.3)	15.9 (± 11.6)	18.7 (± 10.0)	0.04
Lymphocytes × 10 ³ /μl, mean (± SD)	5.7 (± 4.5)	5.3 (± 4.7)	6.7 (± 3.5)	0.01
Monocytes × 10 ³ /μl, mean (± SD)	0.9 (± 0.8)	0.9 (± 0.9)	1.2 (± 0.6)	0.004
Neutrophils × 10 ³ /μl, mean (± SD)	9.9 (± 7.1)	9.6 (± 6.7)	10.5 (± 7.9)	0.62
Eosinophils × 10 ³ /μl, mean (± SD)	0.2 (± 0.2)	0.2 (± 0.2)	0.2 (± 0.2)	0.64
Basophils × 10 ³ /μl, mean (± SD)	0.001 (± 0.01)	0.002 (± 0.01)	0	0.90
Thrombocytes × 10 ³ /μl, mean (± SD)	111.5 (± 98.3)	105.04 (± 82.7)	131.3 (± 137.5)	0.99
Glucose in g/L, mean (± SD)	0.8 (± 0.7)	0.9 (± 0.7)	0.5 (± 0.5)	0.07
Glucose < 0.4 g/L, % (n)	35.7 (25)	22.0 (11)	70.0 (14)	0.17
Urea in g/L, mean (± SD)	0.2 (± 0.2)	0.2 (± 0.1)	0.3 (± 0.3)	0.09
Creatinine in mg/L, mean (± SD)	6.2 (± 7.2)	4.8 (± 3.5)	10.2 (± 12.3)	0.02

SD: Standard deviation; IQR Interquartile range

^a Mann–Whitney U test for quantitative variables, Pearson's Chi2 test for qualitative variables

P-values in bold are < 0.05

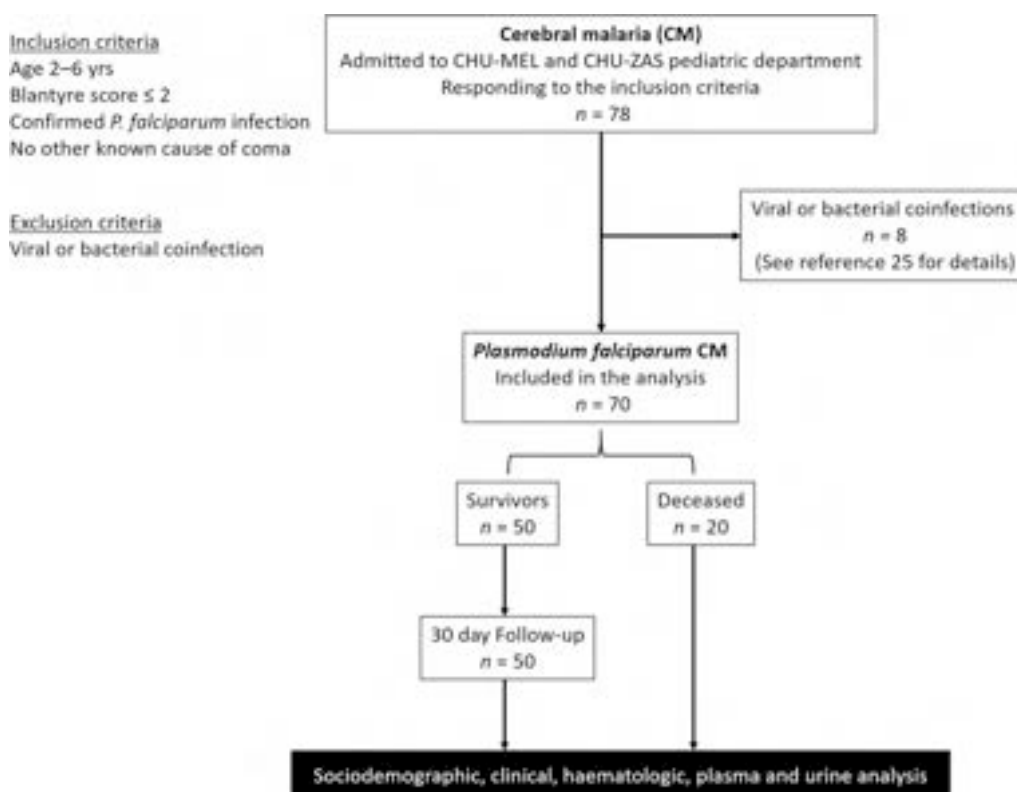


Fig. 1 Flow diagram of the study participants. This study is part of a larger project called NeuroCM, studying non-traumatic coma in children. CM children were recruited from CHU-MEL and CHU-ZAC pediatric departments, two hospital from southern Benin. Here, the study focused on CM due to *Plasmodium falciparum* infection. Patients were excluded due to coinfections. Sociodemographic and clinical data were collected and analysed, as well as urine and blood samples for haematologic and plasma analysis at day 0 and day 30 for survivors

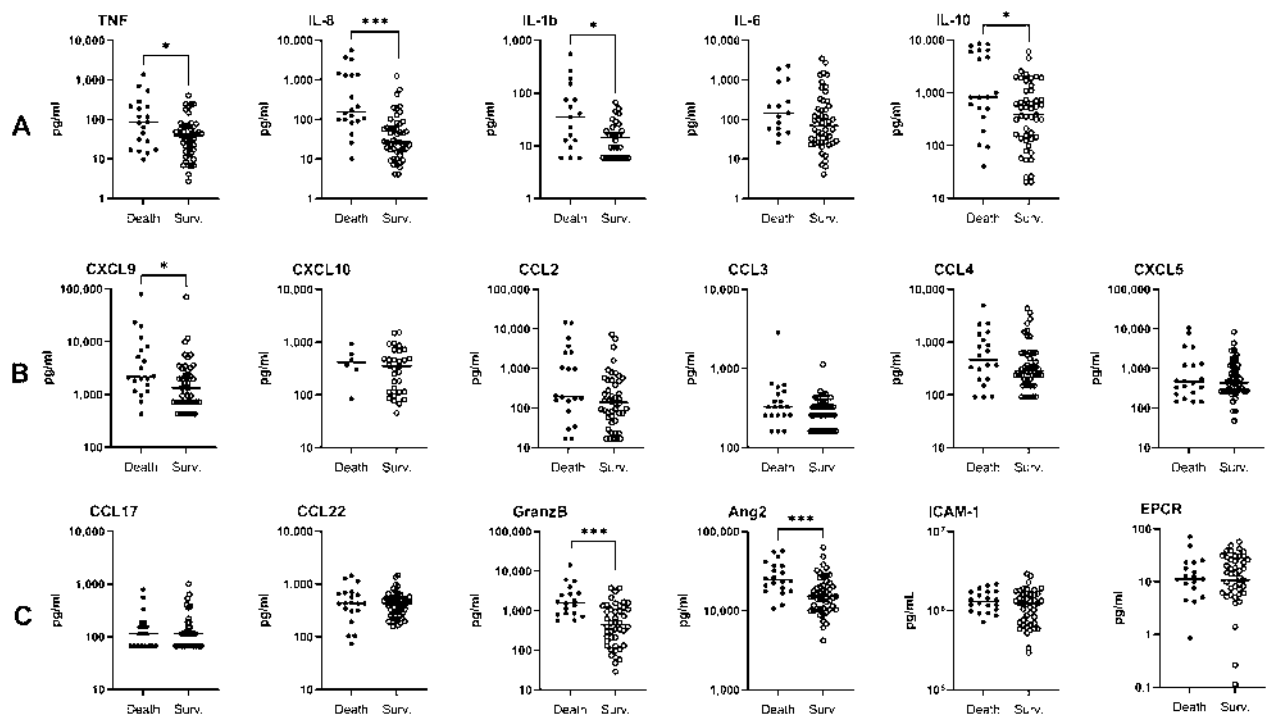


Fig. 2 Plasma biomarker expression levels in children who survived and died. Levels of cytokines, chemokines and markers of endothelial damage and activation were measured in the plasma of children at inclusion (D0) by the Luminex assay and compared between surviving ($n = 50$) and deceased children ($n = 20$) by the Mann–Whitney U test. Values are all in pg/ml. **A** TNF, IL-8, IL- β , IL-6 and IL-10 levels. **B** CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL5. **C** CCL17, CCL22, granzyme B, angiotensin-2, ICAM-1 and EPCR levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$. Surv.: Survival

cytokine IL-10 were higher in children who died, compared to the levels observed in the children who survived, with P -values of Mann–Whitney U tests between 0.03 and < 0.0001 (Fig. 2A). Among chemokines, higher plasma CXCL9 levels, implicated in Th1, CD8 LT and NK trafficking, were associated with death outcome (Fig. 2B, $P = 0.02$). Higher plasma levels of granzyme B and angiotensin-2, a marker of endothelium activation, were also associated with death outcome (Fig. 2C, $P = 0.002$ and 0.0005 , respectively). Interestingly, for urinary markers, increased levels of PGEM, a marker of PGE2 biosynthesis and an inhibitor of the inflammatory response, were related to survival (Fig. 3A, $P = 0.04$). To consolidate our results, we then performed logistic regression to identify the risk factors for death among the plasma and urinary parameters measured in two distinct models (Tables 3 and 4). Table 3 demonstrates that levels equal to or above 57.5 pg/ml of plasma IL-8 constituted a high risk of death during CM ($aOR = 14.2$, $P = 0.002$). The regression analysis did not reveal any other risk factor for death among the plasma factors tested. For the urinary parameters, PGEM levels equal to or above 0.43 ng/mg creatinine constituted a protective factor against

CM death with an adjusted odds ratio of 0.31, but this result was not significant (Table 4, $P = 0.14$).

Increasing levels of plasma CXCL5, CCL17 and CCL22 and urinary 15-F2t-isoprostane are associated with resolution of CM during follow-up

Plasma and urinary values were then followed at D3 and D30 after inclusion (Figs. 4, 5). Plasma levels of TNF, IL-6, IL-10, CXCL10 and ICAM-1 gradually decreased at the three follow-up points (Fig. 4A, B, D), similar to urinary creatinine (Fig. 5A). Conversely, plasma levels of CXCL5, CCL17, and CCL22, as well as urinary 15-F2t-isoprostane, increased from D0 to D30 (Figs. 4C, 5A). Interestingly, plasma IL-8, which was found to be a risk factor for death via regression analysis, showed rapidly decreasing levels, as the values displayed at D3 and D30 were similar [median (25th–75th percentile), 20.1 (14.9–37.0) and 31.3 (19.9–44.4), respectively] but much lower than those at D0 [49.6 (18.3–148)] (Fig. 4A). This phenomenon was also observed for plasma CXCL9, CCL3, CCL4, granzyme B, angiotensin-2, urinary GSH and the urinary GSH:GSSG ratio (Figs. 4B–D and 5B). The evolution of this ratio reflects a more pronounced antioxidant state at D0 than at D3 and D30, as well as

Table 3 Immunological factors measured in plasma associated with death among cerebral malaria infants, multivariate logistic regression

Factors		Survival, % (n)	Death, % (n)	Univariate analysis		Multivariate analysis	
				OR (95% CI)	P-value	aOR (95% CI)	P-value
TNF (pg/ml)	< 41.4	79.4 (27)	20.6 (7)	1			
	≥ 41.4	62.9 (22)	37.1 (13)	2.27 (0.78–6.69)	0.13		
IL-8 (pg/ml)	< 57.5	91.7 (33)	8.3 (3)	1		1	
	≥ 57.5	48.5 (16)	51.5 (17)	11.7 (2.98–45.8)	0.004	14.2 (2.56–78.4)	0.002
IL-10 (pg/ml)	< 541.2	80.0 (28)	20.0 (7)	1			
	≥ 541.2	61.8 (21)	38.2 (13)	2.48 (0.84–7.28)	0.10		
CCL2 (pg/ml)	< 172.9	78.8 (26)	21.2 (7)	1			
	≥ 172.9	60.6 (20)	39.4 (13)	2.41 (0.81–7.17)	0.11		
Angiopietin-2 (pg/ml)	< 17,774	88.6 (31)	11.4 (4)	1			
	≥ 17,774	52.9 (18)	47.1 (16)	6.89 (1.99–23.8)	0.002		
CCL4 (pg/ml)	< 336.6	78.1 (25)	21.9 (7)	1			
	≥ 336.6	61.8 (21)	38.2 (13)	2.21 (0.75–6.55)	0.15		
CXCL9 (pg/ml)	< 1823.1	80.6 (25)	19.4 (6)	1			
	≥ 1823.1	56.2 (18)	43.7 (14)	3.24 (1.04–10.1)	0.04		
Granzyme B (pg/ml)	< 792.4	87.5 (28)	12.5 (4)	1			
	≥ 792.4	53.3 (16)	46.7 (14)	6.12 (1.72–21.8)	0.005		

OR Odd ratio; aOR Adjusted odd ratio, adjusted for Blantyre score, presence of icterus, hypoglycaemia, and blood creatinine; CI Confidence interval
P-values in bold are < 0.05

Table 4 Immunological factors measured in urine associated with death among cerebral malaria infant, multivariate logistic regression, n = 70

Factors		Survival, % (n)	Death, % (n)	Univariate analysis		Multivariate analysis	
				OR (95% CI)	P-value	aOR (95% CI)	P-value
Urinary creatinine (mg/ml)	< 0.60	87.1 (27)	12.9 (4)	1			
	≥ 0.60	70.9 (22)	29.0 (9)	2.76 (0.75–10.2)	0.13		
LXA4/creatinine (ng/mg)	< 0.79	68.9 (20)	32.3 (10)	1			
	≥ 0.79	87.1 (27)	12.9 (4)	0.31 (0.08–1.13)	0.08		
IsoP/creatinine (ng/mg)	< 4.63	68.7 (22)	31.3 (10)	1			
	≥ 4.63	90.0 (27)	10.0 (3)	0.24 (0.06–0.99)	0.05		
PGEM/creatinine (ng/mg)	< 0.43	67.7 (21)	32.3 (10)	1		1	
	≥ 0.43	89.7 (26)	10.3 (3)	0.24 (0.06–0.99)	0.05	0.31 (0.06–1.49)	0.14

OR Odd ratio; aOR Adjusted odd ratio; adjusted for Blantyre score, presence of icterus, hypoglycaemia, and blood creatinine; CI Confidence interval

the evolution of 15-F2t-isoprostane levels during follow-up (Fig. 5A). Urinary levels of PGEM, LTB4, LXA4 and GSSG were similar at D0 and D3 and displayed an increase at D30 (Fig. 5A and B), which reflects either a longer impact of the disease on their levels or a specific involvement in the resolution phase. Finally, CCL2 showed a fluctuating level during monitoring, with a level that dropped sharply from D0 to D3 and then increased from D3 to D30 (Fig. 4B). However, the level measured at D30 remained much lower than that observed at D0 ($P < 0.0001$).

Discussion

The aim of this study was to identify predictive factors of death or survival during CM. To this end, 70 Beninese children with CM (50 who survived and 20 who died) were included in the present study, which is part of a larger project named NeuroCM [26]. In this analysis, we chose to focus only on subjects with CM. This choice of analysis, which excluded UM subjects, allowed us to work on a clinically homogeneous group and to identify relevant risk factors for death.

An accurate differential diagnosis was achieved through thorough clinical examination, including fundoscopic

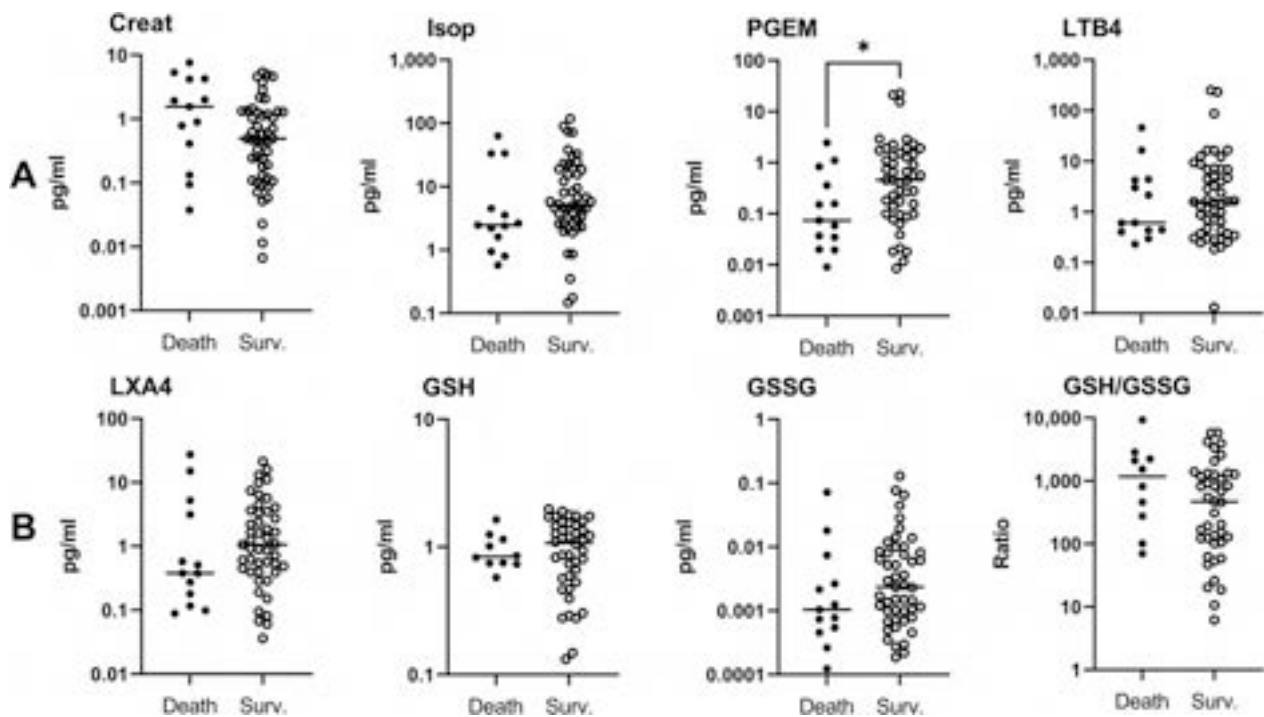


Fig. 3 Urinary biomarker expression levels in children who survived and died. Levels of creatinine, 15-F2t-isoprostane (Isop), PGE2 metabolites (PGEM), LTB4, LXA4, reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were measured in the urine of children at inclusion (D0) by enzyme immunoassays kits and compared between surviving ($n=50$) and deceased children ($n=20$) by the Mann–Whitney U test. Values are all in pg/ml. **A** Creatinine, 15-F2t-isoprostane, PGEM, and LTB4 levels. **B** LXA4, GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$. Surv.: Survival

examination and extensive blood biochemical analysis associated with the molecular diagnosis of microbial infections in the patients’ cerebrospinal fluid. Fundoscopic examination was difficult to perform and could not be performed on the children with the most severe conditions; the data are rather indicative. This approach resulted in a homogeneous group of CM patients thanks to the exclusion of coinfections and nonmalarial comas. In a previous paper dealing with the NeuroCM study, a multivariate analysis revealed that high bilirubin (jaundice) and lactate levels were predictive of early death in Beninese children with nontraumatic coma, whereas the use of antibiotics before admission and yellow fever vaccination were protective factors [25]. In our study, similar associations were found in the univariate analysis, except for vaccination against yellow fever. The similar results obtained for jaundice, hyperlactatemia and previous antibiotic use suggest that such a clinical profile is more specific to coma, including CM-related coma, than to CM itself. Interestingly, a lower Blantyre score and splenomegaly were also identified as risk factors for CM death. A more pronounced coma was previously described as a risk factor for death during severe malaria in children [28], in adults presenting with CM [29], and in children

presenting with CM [30, 31]. Splenomegaly is also a clinical manifestation classically described in cerebral malaria [32, 33], although rarely identified as a risk factor for death during CM. Through the analysis of haematologic factors, we observed higher numbers of leukocytes, among which lymphocytes and monocytes were associated with CM death, indicating an increased immune response related to the infection. Higher creatinine levels were also associated with death in CM children, suggesting that renal damage was involved in the death of patients.

We then analysed death risk factors among specific plasma and urinary mediators of both inflammatory and oxidative responses. We found by univariate analysis that plasma levels of TNF, IL-8, IL-1 β , IL-10, CXCL9, granzyme B and angiopoietin-2 measured at the acute phase (D0) were higher in children who died compared to those who survived. For urinary mediators, lower levels of PGEM at D0 were associated with CM death through univariate analysis. However, a higher initial level of plasma IL-8 alone was identified as a risk factor for death by multivariate analysis. Plasma and urinary levels measured during convalescence (D3 and D30) confirmed these trends and suggested two kinds of marker

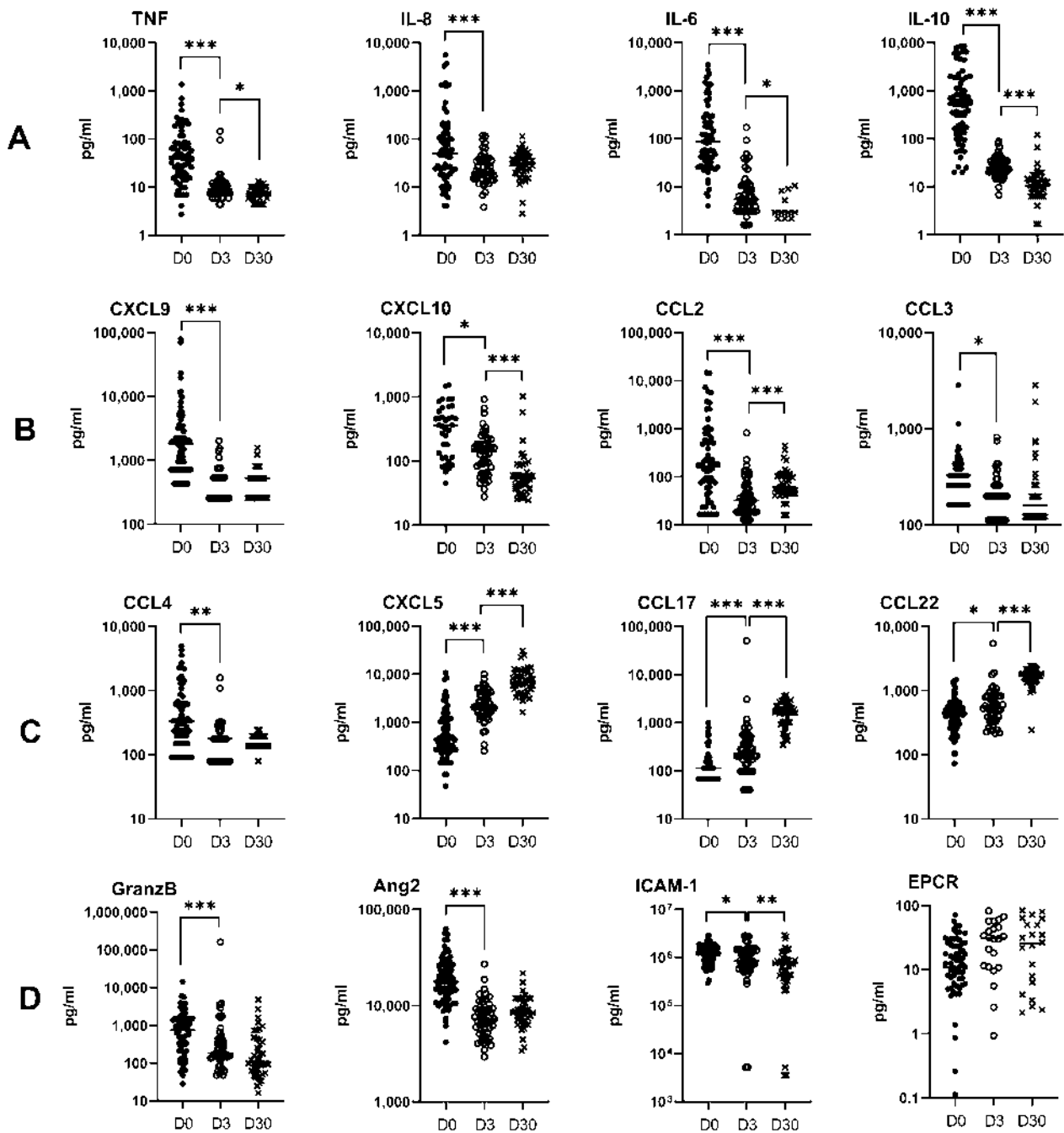


Fig. 4 Kinetics of plasma biomarkers during and after CM (surviving children at D0, D3, D30). Levels of cytokines, chemokines and markers of endothelial damage and activation were measured in the plasma of children at inclusion (D0) and 3 (D3) and 30 days (D30) after inclusion by Luminex assay. Two-by-two comparisons (D0 to D3 and D3 to D30) were carried out by the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Values are all in pg/ml. **A** TNF, IL-8, IL-6 and IL-10 levels. **B** CXCL9, CXCL10, CCL2, CCL3. **C** CCL4, CXCL5, CCL17, CCL22. **D** Granzyme B, angiotensin-2, ICAM-1 and EPCR levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$

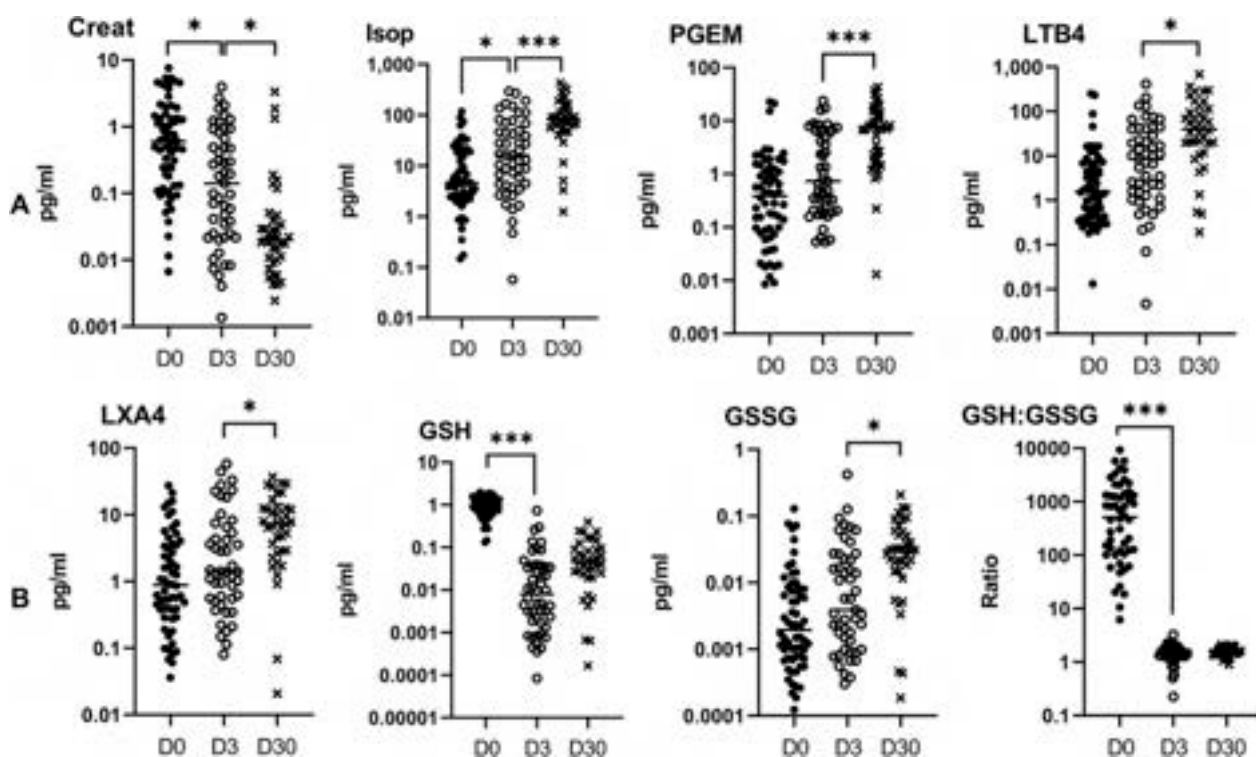


Fig. 5 Kinetics of urinary biomarkers during and after CM (surviving children at D0, D3, D30). Levels of creatinine, 15-F2t-isoprostane (Isop), PGE2 metabolites (PGEM), LTB4, LXA4, reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione were measured in the urine of children at inclusion (D0) and 3 (D3) and 30 days (D30) after inclusion by enzyme immunoassays kits. Two-by-two comparisons (D0 to D3 and D3 to D30) were carried out by the Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Values are all in pg/ml. **A** Creatinine, 15-F2t-isoprostane, PGEM, and LTB4 levels. **B** LXA4, GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio levels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$

profiles: a disease severity profile for decreasing markers including plasma TNF, IL-8, IL-10, CXCL9, granzyme B, angiopoietin-2, along with plasma IL-6, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, ICAM-1, and urinary creatinine, GSH and GSH:GSSG ratio; and a disease resolution profile for increasing markers including plasma CXCL5, CCL17, CCL22, and urinary PGEM, 15-F2t-isoprostane, LTB4, LXA4, and GSSG. It is important to note that the values obtained at D3 and D30 all belong to surviving children, as all deaths occurred before D3.

In line with our results, previous studies have reported associations between malaria severity or death and pro-inflammatory cytokines and the anti-inflammatory cytokine IL-10 [34–40]. During CM, proinflammatory cytokines such as TNF and IL-1 β are thought to induce endothelial activation, as demonstrated in vitro [41, 42], and to play a major role in iRBC sequestration in cerebral micro vessels [14, 43] through overexpression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM), accumulation of cytotoxic CD8+ T cells and alteration of the BBB [14, 44]. An increase in plasma IL-1 β along with IL-10 and TNF has also previously been associated with CM outcome [37]. However, the implication of IL-10, an

anti-inflammatory cytokine involved in the inhibition of proinflammatory responses and the development of regulatory responses, is discussed more. It has been shown in mice that the absence of IL-10 expression was associated with the development of severe malaria and excess mortality, suggesting a protective role [45, 46], whereas high plasma IL-10 levels in humans were correlated with malaria severity and death [14, 39, 47]. Our results are in line with most human studies suggesting a role for high plasma IL-10 in malaria severity and CM death.

Among the plasma markers measured, high levels of IL-8 constituted the most significant risk of death (odds ratio 14.2) in our study. Other studies also reported a significant association of high levels of plasma or serum IL-8 with severity or death among severe cases [severe malarial anaemia (SMA) or cerebral malaria] [40, 48]. Concerning more specifically CM, Pappa et al. showed a positive and significant correlation between plasma IL-8 levels and brain volume in CM children [49]. Such a correlation was also found for TNF, CCL2 and IL-10, in line with our results. Interestingly, elevated cerebrospinal IL-8 levels, but not serum IL-8 levels, were identified as a marker of CM death among children who died of CM,

SMA, or nonmalaria causes [50]. However, in this study, samples were collected after death. Finally, a recent study reported higher levels of IL-8 in retinopathy-positive CM children who died than in survivors and UM children, similar to our results [51]. The authors claim that retinopathy diagnosis improves clinical CM specificity, as it is related to iRBC sequestration in brain. In our case, we think that our diagnosis strategy was sufficiently thorough to ensure the selection of real CM cases. IL-8 is a chemokine whose main function is the promotion of neutrophil activation and migration to sites of inflammation; activated neutrophils also produce IL-8 themselves, reinforcing the inflammatory loop [13]. During CM, neutrophils can play both a beneficial role by killing blood-stage parasites [52] but also a deleterious role through ROS production and toxic mediator release such as neutrophil extracellular traps (NETs), leading to an alteration of the brain endothelium and increased iRBC sequestration [53–56]. Plasma levels of NET components were shown to be higher in severe malaria patients and to promote parasite sequestration and tissue damage in a murine malaria model [56]. Although ECM studies report leucocyte accumulation in the brain [57], autopsies carried out in humans after CM death rarely reported neutrophil accumulation in brains [58–60], suggesting a putative effect of neutrophils through their activation and ability to produce soluble factors rather than their migration to inflammation sites. Thus, high IL-8 levels may mostly participate in neutrophil activation. In addition, a disease resolution profile was obtained for CXCL5, a chemokine implicated in neutrophil trafficking [13], with increasing levels from D0 to D30 in surviving children. This results reinforce our hypothesis of the importance of neutrophil activation rather than migration to inflammation sites. Interestingly, IL-8 has also been identified as a pharmacological target to reduce ischaemia-induced myocardial injury [61], suggesting that decreasing or neutralizing plasma IL-8 could help reduce neuroinflammation and ischaemia during CM.

In our study, among chemokines other than IL-8, only the level of plasma CXCL9 was related to CM death. This is a surprising result, as high levels of CXCL10 and CCL2 have been frequently reported as markers of severity and death during malaria and even CM [36, 39, 62, 63]. For CXCL10, the low number of doses carried out successfully may explain our result. To our knowledge, this is the first time that a study highlights a correlation between CXCL9 and death in CM patients. However, its deleterious implication during ECM has already been demonstrated [64], and an increase in its gene expression has been observed in the brains of infected mice [65]. CXCL9 is known for its involvement in CD8 T-cell migration to the brain and in their activation leading to the release of

granzyme B and brain endothelium alteration, as demonstrated in ECM [66, 67]. Two recent studies have highlighted the involvement of CD8 T cells in human CM through their localization in the brains of Malawian children who died of CM [68, 69]. Kaminski et al. also observed higher plasma levels of granzyme B during malaria infection compared to healthy patients and an increased proportion of blood CD8⁺/GrzB⁺ T cells in severe malaria patients [70]. Such results combined with ours support the idea that CXCL9 and granzyme B are players in the neuroinflammatory response during CM. Conversely, CCL17 and CCL2 which are known for their implication in Th2 response and regulatory T cell migration [13], were found to be associated with disease resolution in surviving children.

Elevated plasma angiopoietin-2 and soluble ICAM-1 are two markers of endothelium activation and increased permeability that were previously associated with malaria severity and risk of cognitive impairment [71, 72]. In our study, elevated levels of angiopoietin-2, a marker of increased vascular permeability, were also found in patients who died compared to those who survived. However, the levels of plasma soluble ICAM-1 did not differ between groups, suggesting that the level of angiopoietin-2 is a better prognostic marker of death than the level of soluble ICAM-1.

In urine, we measured some metabolites of arachidonic acid known for their implication in the inflammatory response. Among the metabolites measured, only PGEM was related to CM death with a disease resolution profile, i.e., with lower initial urinary levels in deceased subjects than in surviving subjects. PGEM is the major metabolite of PGE₂, which is unstable *in vivo* and produced via the activation of the enzyme COX-2 [73]. Other teams previously reported lower levels of urinary bicyclo-PGE₂, another PGE₂ metabolite, in severe malarial anaemia patients and CM patients than in those presenting uncomplicated or asymptomatic malaria [23, 24]. These authors also demonstrated that reduced PGE₂ levels were related to downregulation of COX-2 and enhanced uptake of haemozoin by monocytes. In our study, the large number of patients (70 CM subjects in total, of which 20 died and 50 survived) probably helped in identifying a significant relationship between the occurrence of death during CM and low levels of urinary PGEM. In addition, it is important to emphasize that the urinary determination of biological parameters in CM children is an interesting approach because of its ease of implementation and its non-invasive character.

Finally, the evolution of 15-F_{2t}-isoprostane levels and the GSH:GSSG ratio in urine during follow-up of CM children in our study reflects a more pronounced antioxidant balance at D0 and a re-establishment of a more

prooxidant response over the course of the follow-up among CM children who survived. However, these lower levels observed at inclusion were not related to death outcome. This result is surprising, as oxidative damage is thought to contribute to malaria pathogenicity [74]. Additionally, higher levels of urinary F2-isoprostane metabolites were previously reported in patients presenting severe malaria and acute kidney injury than in patients with non-severe malaria [75, 76]. However, our study is the first to analyse the evolution of oxidative markers in urine among CM children. A defect in the oxidative response by the leukocytes of these children could explain these results and provide a new avenue for research.

Our study presents two main limitations: the relatively small number of 70 subjects with CM, which allowed analyses comparing 50 subjects who survived to 20 who died; and the point of biological follow-up at D3 post-inclusion. A posteriori, D3 proved to be too late to measure the evolution of markers in the group of subjects who did not survive, as deaths occurred within the first two days after inclusion in the study. Therefore, marker changes at D3 and D30 only relate to the group of subjects who survived CM.

Conclusions

Multivariate logistic regression highlighted elevated plasma levels of IL-8 as the main risk factor for death during CM. Follow-up of patients at D3 and D30 revealed marker profiles of disease aggravation and resolution for markers implicated in neutrophil activation, endothelium activation and damage, inflammatory and oxidative response, including the striking increase of oxidative markers 15-F2t-isoprostane and GSH:GSSG ratio. These results provide important insight into our understanding of CM pathogenesis and clinical outcomes and may have important therapeutic implications.

Abbreviations

aOR	Adjusted odds ratio
BBB	Blood brain barrier
CCL	C–C motif chemokine ligand
CHU-MEL	Centre Hospitalier Universitaire de la Mère et de l'Enfant Lagune
CHU-ZAS	Centre Hospitalier Universitaire de Zone d'Abomey Calavi/S6-Ava
CI	Confidence interval
CM	Cerebral malaria
Creat	Creatinine
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
D0, D3, D30	Day 0, Day 3, Day 30
ECM	Experimental CM
EPCR	Endothelial protein C receptor
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
iRBCs	Infected red blood cells
IL	Interleukine

iRBC	Infected red blood cell
IQR	Interquartile range
OR	Odds ratio
Isop	15-F2t-isoprostane
PCR	Polymerase chain reaction
PGE2	Prostaglandine E2
PGEM	Prostaglandine E2 metabolite
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standard deviation
TNF	Tumour necrosis factor
UM	Uncomplicated malaria

Acknowledgements

We thank all children and their parents for participating in this study. We are thankful to the nurses and health workers of the CHU-MEL hospital (CHU-Mère et Enfant de la Lagune) and Hopital de zone de Calavi (CHU-ZAS) for their help in the inclusion of patients and collection of samples. Finally, we thank all the members of the NeuroCM group for their contribution to the project. *NeuroCM collaboration group*: Dissou Affolabi (Pediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin); Daniel Ajzenberg (Tropical Neuroepidemiology, INSERM UMR 1094, Limoges, France); Bibiane Biokou (Pediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin); Josselin Brisset (Infectious diseases and tropical medicine department, Limoges University Hospital, Limoges, France); Jean-Eudes Degbelo (Institut de Recherche Clinique du Bénin—IRCB, Calavi, Benin); Philippe Deloron (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Latifou Dramane (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris); Sayeh Jafari-Guemouri (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Claire Kamaliddin (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Elisée Kinkpé (Paediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin); Anaïs Labrunie (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France); Thomas Lathiere (Ophtalmology department, Limoges University Hospital, Limoges, France); Achille Massougbodji (Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Calavi, Benin); Audrey Mowendabeka (Paediatric Department, Hopital de la Mère et de l'Enfant, Limoges, France); Jade Papin (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Bernard Pipy (RESTORE Research Center, Université de Toulouse, INSERM, CNRS, EFS, UPS, 31100 Toulouse, France); Pierre-Marie Preux (EpiMaCT, INSERM, IRD, Université de Limoges, Limoges, France); Marie Raymondeau (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France); Darius Sossou (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris); Brigitte Techer (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Laurence Watier (Center for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), INSERM U1018, Paris-Saclay University, UVSQ, Montigny-Le-Bretonneux, France).

Author contributions

JR, BV, JFF and AA conceptualized the study. JR and BV performed experiments under AA supervision. MA analysed the data with AA and MC providing oversight/supervision. EK and LA recruited patients and provided clinical data with IDD, YL, MJA and JFF providing oversight/supervision. GIB supervised patient's recruitment. SH supervised hematologic analysis. FB managed and controlled the database. JR, BV and AA wrote the manuscript with inputs from all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by a grant from the French National Research Agency (ANR-17-CE17-0001), including a PhD grant for Jade Royo. Bertin Vianou received a PHD grant called Research grant for a thesis in the South (ARTS) from the Institut de Recherche pour le Développement France (IRD).

Availability of data and materials

The datasets used during the current study are available with principal investigator.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The NeuroCM study was approved by the «Comité National d'Ethique pour la Recherche en santé of Benin» (n°67/MS/DC/SGM/DRFMT/CNERS/SA; 10/17/2017) and by the «Comité consultatif de déontologie et d'éthique of Institut de Recherche pour le Développement» (IRD; 10/24/2017). Written

informed consent was obtained from the parents or guardians of all study participants.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹UMR152 PHARMADEV, IRD, UPS, Toulouse University, 35 Chemin Des Maraichers, 31400 Toulouse, France. ²Clinical Research Institute of Benin (IRCB), Abomey Calavi, Benin. ³Faculty of Infectious and Tropical Diseases, Disease Control Department, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK. ⁴Paediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin. ⁵Paediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin. ⁶UMR261 MERIT, IRD, Paris University, Paris, France. ⁷UMR 1094 EpiMaCT, Inserm, Limoges University Hospital, Limoges University, Limoges, France. ⁸French Malaria Reference Center, APHP, Bichat Hospital, Paris, France. ⁹Parasitology Laboratory, APHP, Bichat-Claude-Bernard Hospital, Paris, France. ¹⁰Infectious Diseases and Tropical Medicine Department, Limoges University Hospital, Limoges, France.

Received: 16 November 2022 Accepted: 26 January 2023

Published online: 09 February 2023

References

- World Health Organization. World malaria report. Geneva: World Health Organization; 2020.
- Oluwayemi IO, Brown BJ, Oyedeji OA, Oluwayemi MA. Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria. *Pan Afr Med J*. 2013;15:88.
- World Health Organization. Management of severe malaria: a practical handbook. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2012.
- Mallewa M, Vallye P, Faragher B, Banda D, Klapper P, Mukaka M, et al. Viral CNS infections in children from a malaria-endemic area of Malawi: a prospective cohort study. *Lancet Glob Health*. 2013;1:e153–160.
- Beare NAV, Taylor TE, Harding SP, Lewallen S, Molyneux ME. Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:790–7.
- Pongponrath E, Turner GDH, Day NPJ, Phu NH, Simpson JA, Stepniewska K, et al. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;69:345–59.
- Craig A, Scherf A. Molecules on the surface of the *Plasmodium falciparum* infected erythrocyte and their role in malaria pathogenesis and immune evasion. *Mol Biochem Parasitol*. 2001;115:129–43.
- Gillrie MR, Lee K, Gowda DC, Davis SP, Monestier M, Cui L, et al. *Plasmodium falciparum* histones induce endothelial proinflammatory response and barrier dysfunction. *Am J Pathol*. 2012;180:1028–39.
- Hochman SE, Madaline TF, Wassmer SC, Mbale E, Choi N, Seydel KB, et al. Fatal pediatric cerebral malaria is associated with intravascular monocytes and platelets that are increased with HIV coinfection. *MBio*. 2015;6:e01390–e11315.
- Medana IM, Turner GDH. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol*. 2006;36:555–68.
- Turner GD, Ly VC, Nguyen TH, Tran TH, Nguyen HP, Bethell D, et al. Systemic endothelial activation occurs in both mild and severe malaria. Correlating dermal microvascular endothelial cell phenotype and soluble cell adhesion molecules with disease severity. *Am J Pathol*. 1998;152:1477–87.
- Pereira DM, Carvalho Júnior AR, Lacerda EM, da Silva LC, Marinho CR, André E, et al. Oxidative and nitrosative stresses in cerebral malaria: can we target them to avoid a bad prognosis? *J Antimicrob Chemother*. 2020;75:1363–73.
- Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659–702.
- Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:324.
- He R, Chen Y, Cai Q. The role of the LTB4-BLT1 axis in health and disease. *Pharmacol Res*. 2020;158: 104857.
- Natarajan R, Nadler JL. Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1542–8.
- Praticò D, Zhukareva V, Yao Y, Uryu K, Funk CD, Lawson JA, et al. 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease: possible involvement in brain oxidative stress. *Am J Pathol*. 2004;164:1655–62.
- Wu Z, Chen C, Zhang Q, Bao J, Fan Q, Li R, et al. Arachidonic acid metabolism is elevated in *Mycoplasma gallisepticum* and *Escherichia coli* co-infection and induces LTC4 in serum as the biomarker for detecting poultry respiratory disease. *Virulence*. 2020;11:730–8.
- Atiku SM, Louise N, Kasozi DM. Severe oxidative stress in sickle cell disease patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Kampala, Uganda. *BMC Infect Dis*. 2019;19:600.
- Zanini GM, Martins YC, Cabrales P, Frangos JA, Carvalho LJM. S-nitroso-glutathione prevents experimental cerebral malaria. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7:477–87.
- Shryock N, McBerry C, Salazar Gonzalez RM, Janes S, Costa FTM, Aliberti J. Lipoxin A₄ and 15-epi-lipoxin A₄ protect against experimental cerebral malaria by inhibiting IL-12/IFN- γ in the brain. *PLoS ONE*. 2013;8: e61882.
- Souza MC, Pádua TA, Torres ND, Souza Costa MF, Candéa AP, Marmalido T, et al. Lipoxin A4 attenuates endothelial dysfunction during experimental cerebral malaria. *Int Immunopharmacol*. 2015;24:400–7.
- Perkins DJ, Hittner JB, Mwaikambo ED, Granger DL, Weinberg JB, Anstey NM. Impaired systemic production of prostaglandin E2 in children with cerebral malaria. *J Infect Dis*. 2005;191:1548–57.
- Anyona SB, Kempaiah P, Raballah E, Davenport GC, Were T, Konah SN, et al. Reduced systemic bicyclo-prostaglandin-E2 and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia. *Am J Hematol*. 2012;87:782–9.
- Brisset J, Angendu Baki K, Watier L, Kinkpé E, Bailly J, Ayédadjou L, et al. Non-traumatic coma in young children in Benin: are viral and bacterial infections gaining ground on cerebral malaria? *Infect Dis Poverty*. 2022;11:29.
- Joste V, Maurice L, Bertin GI, Aubouy A, Boumédiène F, Houzé S, et al. Identification of *Plasmodium falciparum* and host factors associated with cerebral malaria: description of the protocol for a prospective, case-control study in Benin (NeuroCM). *BMJ Open*. 2019;9: e027378.
- Yan Z, Mas E, Mori TA, Croft KD, Barden AE. A significant proportion of F2-isoprostanes in human urine are excreted as glucuronide conjugates. *Anal Biochem*. 2010;403:126–8.
- Ranque S, Poudiougou B, Traoré A, Keita M, Oumar AA, Safeukui I, et al. Life-threatening malaria in African children: a prospective study in a mesoendemic urban setting. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:130–5.
- Sattar MA, Hoque HW, Amin MR, Faiz MA, Rahman MR. Neurological findings and outcome in adult cerebral malaria, Bangladesh. *Med Res Counc Bull*. 2009;35:15–7.
- Genton B, Al-Yaman F, Alpers MP, Mokela D. Indicators of fatal outcome in paediatric cerebral malaria: a study of 134 comatose Papua New Guinean children. *Int J Epidemiol*. 1997;26:670–6.
- Jaffar S, Van Hensbroek MB, Palmer A, Schneider G, Greenwood B. Predictors of a fatal outcome following childhood cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57:20–4.
- Idro R, Jenkins NE, Newton CRJC. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol*. 2005;4:827–40.
- Song X, Wei W, Cheng W, Zhu H, Wang W, Dong H, et al. Cerebral malaria induced by *Plasmodium falciparum*: clinical features, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12: 939532.
- Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, et al. Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med*. 1989;320:1586–91.
- Shabani E, Ouma BJ, Idro R, Bangirana P, Opoka RO, Park GS, et al. Elevated cerebrospinal fluid tumour necrosis factor is associated with acute and long-term neurocognitive impairment in cerebral malaria. *Parasite Immunol*. 2017;39: e12438.
- Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*. 1990;336:1201–4.
- Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave PA, Mishra GC, Pied S. Clusters of cytokines determine malaria severity in *Plasmodium falciparum*-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis*. 2006;194:198–207.

38. Popa GL, Popa MI. Recent advances in understanding the inflammatory response in malaria: a review of the dual role of cytokines. *J Immunol Res*. 2021;2021:7785180.
39. Royo J, Rahabi M, Kamaliddin C, Ezinmegnon S, Olanier D, Authier H, et al. Changes in monocyte subsets are associated with clinical outcomes in severe malarial anaemia and cerebral malaria. *Sci Rep*. 2019;9:17545.
40. Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Drayson MT, Molyneux ME, MacLennan CA. Cytokine profiles in Malawian children presenting with uncomplicated malaria, severe malarial anaemia, and cerebral malaria. *Clin Vaccine Immunol*. 2017;24:e00533-e616.
41. Cavender DE, Edelbaum D, Ziff M. Endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Am J Pathol*. 1989;134:551–60.
42. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*. 1990;70:427–51.
43. Gimenez F, Barraud de Lagerie S, Fernandez C, Pino P, Mazier D. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60:1623–35.
44. Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol*. 1997;150:1473–86.
45. Sanni LA, Jarra W, Li C, Langhorne J. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infect Immun*. 2004;72:3054–8.
46. Li C, Sanni LA, Omer F, Riley E, Langhorne J. Pathology of *Plasmodium chabaudi* infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies. *Infect Immun*. 2003;71:4850–6.
47. Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, et al. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet*. 1998;351:1768–72.
48. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe *Plasmodium falciparum* malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun*. 2004;72:5630–7.
49. Pappa V, Seydel K, Gupta S, Feintuch CM, Potchen MJ, Kampondeni S, et al. Lipid metabolites of the phospholipase A2 pathway and inflammatory cytokines are associated with brain volume in paediatric cerebral malaria. *Malar J*. 2015;14:513.
50. Armah HB, Wilson NO, Sarfo BY, Powell MD, Bond VC, Anderson W, et al. Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J*. 2007;6:147.
51. Vera IM, Kessler A, Ting LM, Harawa V, Keller T, Allen D, et al. Plasma cell-free DNA predicts pediatric cerebral malaria severity. *JCI Insight*. 2020;5:136279.
52. Zelter T, Strahilevitz J, Simantov K, Yajuk O, Adams Y, Ramstedt Jensen A, et al. Neutrophils impose strong immune pressure against PfEMP1 variants implicated in cerebral malaria. *EMBO Rep*. 2022;23: e53641.
53. Feintuch CM, Saidi A, Seydel K, Chen G, Goldman-Yassen A, Mita-Mendoza NK, et al. Activated neutrophils are associated with pediatric cerebral malaria vasculopathy in Malawian children. *mBio*. 2016;7:e01300-01315.
54. Yang JJ, Kettritz R, Falk RJ, Jennette JC, Gaido ML. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. *Am J Pathol*. 1996;149:1617–26.
55. Aitken EH, Alemu A, Rogerson SJ. Neutrophils and malaria. *Front Immunol*. 2018;9:3005.
56. Knackstedt SL, Georgiadou A, Apel F, Abu-Abed U, Moxon CA, Cunningham AJ, et al. Neutrophil extracellular traps drive inflammatory pathogenesis in malaria. *Sci Immunol*. 2019;4:eaaw0336.
57. White NJ, Turner GDH, Medana IM, Dondorp AM, Day NPJ. The murine cerebral malaria phenomenon. *Trends Parasitol*. 2010;26:11–5.
58. Armah H, Dodoo AK, Wiredu EK, Stiles JK, Adjei AA, Gyasi RK, et al. High-level cerebellar expression of cytokines and adhesion molecules in fatal, paediatric, cerebral malaria. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005;99:629–47.
59. Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, Fu W, Whitten RO, Milner D, et al. The neuropathology of fatal cerebral malaria in Malawian children. *Am J Pathol*. 2011;178:2146–58.
60. MacCormick IJC, Barrera V, Beare NAV, Czanner G, Potchen M, Kampondeni S, et al. How does blood-retinal barrier breakdown relate to death and disability in pediatric cerebral malaria? *J Infect Dis*. 2022;225:1070–80.
61. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost*. 2007;97:738–47.
62. Ioannidis LJ, Nie CQ, Hansen DS. The role of chemokines in severe malaria: more than meets the eye. *Parasitology*. 2014;141:602–13.
63. Wilson NO, Jain V, Roberts CE, Lucchi N, Joel PK, Singh MP, et al. CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria. *Dis Markers*. 2011;30:39–49.
64. Campanella GSV, Tager AM, El Khoury JK, Thomas SY, Abrazinski TA, Manice LA, et al. Chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9 and CXCL10 are required for the development of murine cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:4814–9.
65. Miu J, Mitchell AJ, Müller M, Carter SL, Manders PM, McQuillan JA, et al. Chemokine gene expression during fatal murine cerebral malaria and protection due to CXCR3 deficiency. *J Immunol*. 2008;180:1217–30.
66. Howland SW, Poh CM, Rénia L. Activated brain endothelial cells cross-present malaria antigen. *PLoS Pathog*. 2015;11: e1004963.
67. Haque A, Best SE, Unosson K, Amante FH, de Labastida F, Anstey NM, et al. Granzyme B expression by CD8+ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. *J Immunol*. 2011;186:6148–56.
68. Barrera V, Haley MJ, Strangward P, Attree E, Kamiza S, Seydel KB, et al. Comparison of CD8+ T cell accumulation in the brain during human and murine cerebral malaria. *Front Immunol*. 2019;10:1747.
69. Riggle BA, Manglani M, Maric D, Johnson KR, Lee MH, Neto OLA, et al. CD8+ T cells target cerebrovasculature in children with cerebral malaria. *J Clin Invest*. 2020;130:1128–38.
70. Kaminski LC, Riehn M, Abel A, Steeg C, Yar DD, Addai-Mensah O, et al. Cytotoxic T cell-derived granzyme B is increased in severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Front Immunol*. 2019;10:2917.
71. Adukpo S, Kusi KA, Ofori MF, Tetteh JKA, Amoako-Sakyi D, Goka BQ, et al. High plasma levels of soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 are associated with cerebral malaria. *PLoS ONE*. 2013;8: e84181.
72. Ouma BJ, Ssenkusu JM, Shabani E, Datta D, Opoka RO, Idro R, et al. Endothelial activation, acute kidney injury, and cognitive impairment in pediatric severe malaria. *Crit Care Med*. 2020;48:e734–43.
73. Idborg H, Pawelzik SC. Prostanoid metabolites as biomarkers in human disease. *Metabolites*. 2022;12:721.
74. Vasquez M, Zuniga M, Rodriguez A. Oxidative stress and pathogenesis in malaria. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11: 768182.
75. Charunwatthana P, Faiz MA, Ruangveerayut R, Maude R, Rahman MR, Roberts LJ, et al. N-acetylcysteine as adjunctive treatment in severe malaria: a randomized double blinded placebo controlled clinical trial. *Crit Care Med*. 2009;37:516–22.
76. Plewes K, Kingston HWF, Ghose A, Maude RJ, Herdman MT, Leopold SJ, et al. Cell-free hemoglobin mediated oxidative stress is associated with acute kidney injury and renal replacement therapy in severe falciparum malaria: an observational study. *BMC Infect Dis*. 2017;17:313.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



IV- Discussion générale

Le paludisme est l'une des principales maladies parasitaires les plus répandues dans les régions inter-tropicales. En Afrique et particulièrement au Bénin, le paludisme reste la première cause de morbidité et de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans avec près de 80% des décès dus au paludisme en 2021 (2). Parmi les cinq espèces de parasites plasmodiaux responsables du paludisme chez l'homme, *P. falciparum* est le principal parasite responsable de maladies graves et de décès liés au paludisme. Dans les régions d'endémicité palustre, la gravité et la fréquence du paludisme clinique diminuent avec l'âge et l'exposition répétée aux infections, ce qui reflète l'acquisition d'une immunité spécifique (264). Malgré les efforts importants de la communauté scientifique pour mieux appréhender les mécanismes de virulence du parasite, les connaissances sur les mécanismes de l'immunité protectrice contre le paludisme à *P. falciparum* chez l'homme demeurent limitées, ce qui constitue un obstacle majeur à la mise au point de stratégies thérapeutiques efficaces.

Dans le genre *Plasmodium*, *P. falciparum* a développé divers moyens d'échapper au système immunitaire de l'hôte au cours de son cycle érythrocytaire, dont deux bien identifiés : 1) l'adhérence des globules rouges infectés aux récepteurs endothéliaux présents sur les parois des vaisseaux sanguins de l'hôte tels que CD36, ICAM-1, CSA et EPCR, évitant ainsi la circulation périphérique et l'élimination par la rate, 2) la variation antigénique pour empêcher la reconnaissance des antigènes de surface par le système immunitaire de l'hôte. *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein-1 (*PfEMP1*) est le principal ligand antigénique responsable de la séquestration parasitaire. Cette séquestration contribue à des manifestations potentiellement mortelles du paludisme, telles que le neuropaludisme.

Deux théories principales 1) l'hypothèse mécanique et 2) l'hypothèse de la "tempête de cytokines" fournissent une explication de la pathogenèse du neuropaludisme. L'hypothèse mécanique est basée sur la contribution de la séquestration intravasculaire des globules rouges qui entraîne de multiples conséquences, notamment l'obstruction vasculaire (265,266). L'hypothèse de la "tempête de cytokines" quant à elle, explique la pathogenèse du neuropaludisme par une production exacerbée de cytokines telles que le TNF, l'IFN γ , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-10 et une activation excessive des cellules immunitaires (267,268). Le contrôle de l'infection à *P. falciparum* au stade sanguin afin d'éviter son évolution vers des formes graves dépend donc d'une réponse immunitaire précoce. Cette réponse implique non seulement la clairance du parasite par les phagocytes, en particulier les monocytes, qui constituent l'une des premières barrières immunitaires capables de limiter la parasitémie par

phagocytose (269). Les monocytes sont également des acteurs clés de la réponse inflammatoire et oxydative, qui participe à la protection de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) en limitant l'activation des cellules endothéliales, véritable barrière protectrice du tissu cérébral. La résolution de la neuroinflammation dépend de l'équilibre des balances inflammatoires et oxydatives.

Au cours des dernières décennies, des efforts considérables ont été déployés pour comprendre les réponses immunitaires dans le contexte du neuropaludisme. À cet égard, notre compréhension des réponses immunitaires adaptatives au paludisme à *P. falciparum* a beaucoup progressé, tandis que le rôle de l'immunité innée a fait l'objet de moins d'attention. Pourtant, il a été démontré que les composants de l'immunité innée, notamment les cellules NK et les macrophages/monocytes jouent un rôle dans la protection de l'hôte contre l'infection palustre (158,270). Le rôle des cellules endothéliales dans l'angiogenèse, la perméabilité de la BHE, l'orientation des réponses inflammatoires et immunitaires a aussi été démontré (139,271). Il est donc surprenant que les interactions hôte-parasite conduisant à la neuroinflammation soient sous-étudiées.

Dans ce contexte, l'objectif de mes travaux de thèse a été d'identifier les facteurs parasitaires et cellulaires impliqués dans les interactions hôtes-parasites délétères pour le patient. Nous avons fait le choix d'aborder le sujet sous trois angles : 1) étudier *ex-vivo* l'impact de la cytoadhérence des GRi sur la réponse endothéliale, 2) décrire la réponse des monocytes chez les patients atteints de neuropaludisme et enfin 3) caractériser les marqueurs plasmatiques et urinaires associés au neuropaludisme.

Cette thèse s'inscrit dans la continuité du projet NeuroCM qui avait pour ambition d'identifier les facteurs parasitaires qui favorisent la neuroinflammation dans un contexte de neuropaludisme et les acteurs cellulaires et moléculaires de la réponse immune innée nécessaires à la résolution de la neuroinflammation (272). Au cours du projet NeuroCM, une cohorte d'enfants souffrant soit de neuropaludisme (n = 70) soit de paludisme simple (n = 96) a été constituée de mars à décembre 2018. La force de cette étude est la caractérisation clinique fine des cas de neuropaludisme, par l'élimination des co-infections et comas non palustres à travers le diagnostic moléculaire des infections microbiennes dans le liquide céphalo-rachidien des patients et les PCR des espèces plasmodiales. Cette approche nous a permis d'avoir un diagnostic différentiel précis et de constituer des groupes cliniques homogènes. Une autre force de cette étude est le suivi des enfants atteints de neuropaludisme jusqu'à la sortie de l'hôpital, puis pour un rendez-vous de contrôle à un mois. Ainsi, des prélèvements ont pu être obtenus à l'inclusion dans l'étude (J0), puis trois et trente jours après l'inclusion (J3, J30). Ceci nous a

permis de récolter des données tant cliniques que biologiques chez les enfants depuis leur admission (phase aiguë de la maladie) jusqu'à leur rétablissement. Cependant, le prélèvement à J3 s'est révélé tardif par rapport aux décès, survenus la plupart dès le premier jour d'admission à l'hôpital. L'autre limite de cette étude est l'absence de cas de paludismes asymptomatiques et de sujets sains dans la cohorte. Nous avons donc fait le choix de comparer les données de neuropaludisme au paludisme simple. Les prélèvements de sang et d'urine réalisés pendant la phase aiguë de l'infection (J0) et au cours du suivi (J3, J30) réalisés chez les sujets CM nous ont permis d'obtenir des informations majeures sur les mécanismes mis en jeu lors du neuropaludisme et de sa résolution et ainsi d'atteindre les objectifs de la thèse.

Dans le cadre de l'étude NeuroCM, j'ai été en charge de la gestion des échantillons biologiques destinés à la recherche. J'ai participé à la mise en place des protocoles de recherche utilisés sur ce projet et j'ai aussi eu la chance de faire mon stage de master 2 sur ce même projet. Dans le cadre de ma thèse, le matériel biologique de NeuroCM (isolats parasitaires, PBMCs, urines) m'a permis d'analyser les interactions hôtes-parasites qui ont eu lieu chez le patient en me focalisant sur la réponse endothéliale et la fonctionnalité des monocytes de même que sur les cytokines/chimiokines et autres acteurs de la réponse inflammatoire et oxydative impliqués dans l'amplification/résolution de la neuroinflammation.

En utilisant un modèle de cytoadhérence *in vitro* (cellules Hbec-5i et isolats parasitaires), nous avons montré à travers les résultats précédemment obtenus lors de mes travaux de recherche de Master 2 (données non publiées) que les isolats issus d'enfants souffrant de neuropaludisme présentaient une forte cytoadhérence aux cellules Hbec-5i en comparaison aux isolats issus d'enfants souffrant de paludisme simple ($P = 0,0001$). La cytoadhérence (séquestration parasitaire) des GRi sur l'endothélium vasculaire cérébral, l'exacerbation de la réponse immunitaire locale et l'activation endothéliale étant considérées comme les principaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la rupture de la BHE au cours du neuropaludisme (226), nous avons fait le choix d'étudier *ex vivo* l'impact strict de la cytoadhérence des GRi sur la réponse endothéliale dans la première partie de cette thèse. Ainsi, nous avons comparé l'effet de la coculture d'isolats parasitaires issus de patients CM ou UM aux cellules HBEC-5i sur l'activation de ces dernières. Afin d'évaluer si un contact direct entre GRi et cellules endothéliales (cellules Hbec-5i) est nécessaire pour induire l'activation endothéliale, deux conditions de co-culture ont été réalisées : 1) en mettant les GRi directement au contact des cellules endothéliales et 2) en évitant le contact entre GRi et cellules endothéliales par l'intermédiaire d'une membrane (« transwell »). Les transwells sont des

dispositifs adaptés aux puits de culture et permettant de faire des co-cultures cellulaires tout en évitant le contact entre les cellules. Il est constitué essentiellement d'une membrane poreuse sur laquelle repose les cellules. En fonction de la taille des pores, certaines molécules peuvent passer à travers. Compte tenu du fait que seules les formes matures (trophozoïtes et schizontes) adhèrent à l'endothélium et qu'un schizonte se rompt au bout de 6 heures pour libérer des mérozoïtes, nous avons pratiqué pendant 6 heures la co-culture entre les formes matures des GRi et les cellules Hbec-5i pendant. Nous avons constaté que le niveau d'expression de transcrite *Nrf2* des cellules Hbec-5i était plus élevé avec les isolats du neuropaludisme, à la fois dans le cas d'un contact cellulaire et sans contact cellulaire. Avec contact, cette expression était encore plus forte. *Nrf2* est un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans le contrôle de l'environnement redox intracellulaire en régulant l'expression de nombreuses enzymes antioxydantes (273). Il a été précédemment montré que *Nrf2* est un facteur protecteur via l'induction de l'hème oxygénase-1 (HO-1), une enzyme qui catabolise l'hème, dans le cas du neuropaludisme expérimental, ainsi que dans le cas du paludisme gestationnel (259,274). D'autres études ont montré que l'activation de *nrf2* est provoquée après une ischémie cérébrale par une génération excessive de ROS (275). La survenue du neuropaludisme serait donc associée à une inhibition de la capacité des monocytes à produire une réponse oxydante, qui pourrait découler de cette activation de *Nrf2* par l'endothélium vasculaire.

Nos résultats ont aussi montré des niveaux d'expression des transcrits *nf-Kβ* et *fadd* des cellules Hbec-5i élevés avec les isolats du neuropaludisme que ce soit en cas contact cellulaire ou non. Cependant, la comparaison dans le groupe neuropaludisme des conditions avec ou sans contact cellulaire n'a révélé aucune différence. Nous avons donc supposé que l'adhérence des isolats n'influçait pas l'expression des transcrits *nf-Kβ* et *fadd*, et que cette surexpression est liée à des particules solubles issus des GRi. *NFκB* joue un rôle crucial dans la régulation de la réponse immunitaire et le maintien d'un équilibre entre la réponse immunitaire protectrice et l'immunopathologie (276). Il a été démontré que l'exposition aux érythrocytes infectés par *P. falciparum* induit une surexpression de *nf-Kβ* dans les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau humain *in vitro* (277) et que la voie NF-kappaB joue un rôle central dans la régulation du transcriptome de l'endothélium modulé par *P. falciparum* (278). L'immunohistochimie des tissus cérébraux post-mortem de patients décédés d'un neuropaludisme a montré que *NFκB* est l'un des facteurs de signalisation qui modulent l'apoptose dans les cellules endothéliales cérébrales (279). De la même manière que *nf-Kβ*, le gène pro-apoptotique *fadd* a été positivement régulé par Hbec-5i co-cultivé avec des GRi de CM par rapport aux GRi d'UM, et ce avec ou sans contact entre CEs et GRi. Comme

précédemment, ce résultat suggère que les facteurs solubles du parasite induisent une surexpression de *fadd*. *fadd* est bien connu pour son implication dans la voie de l'apoptose. FADD clive la procaspase-3 pour produire la caspase-3 active, responsable de l'apoptose (32,33). L'apoptose des CEs pourrait donc résulter de cette surexpression du gène *fadd*. Il est possible que d'autres événements de signalisation cellulaire et stimuli provenant de médiateurs solubles au cours du processus d'infection palustre puissent contribuer à l'apoptose des CEs. Nous avons également observé une surexpression des transcrits *NOSi* des cellules Hbec-5i lorsque ces dernières sont co-incubées avec des isolats d'enfants souffrant de neuropaludisme. La production de *NOSi* est une réponse innée majeure contre *P. falciparum* provenant de diverses cellules comme les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes ou les cellules endothéliales qui ont la capacité de tuer le *Plasmodium* par la production de dérivés de l'oxyde nitrique (NO) (280). De plus, l'expression de *NOSi* a également un rôle protecteur en limitant le recrutement des neutrophiles dans l'inflammation et l'adhésion des GRi à l'endothélium vasculaire à ICAM-1 et VCAM-1 (281). Initialement, *NOSi* était induite par la réponse systémique au TNF- α , à l'IL-1 β , à l'IL-6 ou à l'IFN- γ , mais notre modèle *in vitro* révèle que l'adhérence du phénotype influence l'induction de *NOSi* avec une forte expression dans les cas de neuropaludisme par rapport aux cas de paludisme simple. Bien que l'expression de *NOSi* ait un effet bénéfique sur la croissance du parasite et la cytoadhérence, une expression dérégulée de *NOSi* pourrait devenir neurotoxique en raison de quantités prolongées et excessives de production de NO entraînant l'induction de l'apoptose par le biais du stress oxydatif avec pour conséquence la perturbation de la BHE (282,283). Nos données confirment les fonctions supposées de l'endothélium vasculaire cérébral en tant que capteur des facteurs circulants de *P. falciparum* induisant une réponse immunitaire innée avec des effets bénéfiques ou délétères au cours du neuropaludisme (271).

Par notre approche, la co-culture des isolats avec les cellules endothéliales pendant 6 heures n'a pas permis d'observer de différences de production de cytokines/chémokines par les cellules endothéliales selon les phénotypes d'isolat parasitaire infectant les GR (UM ou CM) et selon le modèle de co-culture (avec adhérence cellulaire ou sans adhérence cellulaire). Ce résultat est surprenant, car il est généralement admis que l'activation des cellules endothéliales est l'un des principaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la rupture de la BHE. Il est possible que la cytoadhérence/séquestration des GRi ne semble pas être la seule explication de l'activation endothéliale observée dans le cas du neuropaludisme. D'autres études ayant utilisé le même modèle de co-culture indiquent que le facteur parasitaire sécrété, produit de préférence par des isolats cliniques provenant de patients atteints de paludisme grave

ou non compliqué, favorisait une activation endothéliale par le biais d'une réponse oxydative exacerbée, d'une réponse pro-inflammatoire, d'une activation de l'apoptose et d'une modification de l'homéostasie endothéliale (284–287). L'hémozoïne, le complexe ADN parasite/histones, HRP2 et le GPI ont déjà été décrites comme interagissant avec la barrière de l'endothélium avec pour conséquence l'augmentation de l'inflammasome, du stress oxydatif et de l'activation de l'endothélium (288). Malgré le fait que des facteurs parasitaires solubles potentiels pourraient être à l'origine des résultats observés, ils n'ont pas été étudiés dans notre travail. Cependant, la conception de ce modèle de co-culture avec une co-incubation limitée à 6 heures a permis de limiter la rupture des schizontes et par la même occasion des composants parasitaires intracellulaires. La différence de quantité de facteurs parasitaires pourrait également être exclue car le même nombre de parasites a été initialement utilisé, ce qui suppose des facteurs parasitaires sécrétés spécifiques influencés par le phénotype du parasite sur l'activation endothéliale. Une durée de 6h d'activation peut cependant être trop courte pour activer la production de protéines par des cellules, durée habituellement utilisée pour étudier les niveaux d'expression géniques.

En conclusion, la cytoadhérence des iRBCs à l'endothélium vasculaire ne semble pas être le seul mécanisme à l'origine de la production de cytokines/chémokines par les CEs. Des facteurs parasitaires ou de l'hôte sécrétés pourraient favoriser une activation endothéliale par une réponse oxydative exacerbée, une réponse pro-inflammatoire, une activation de l'apoptose et une modification de l'homéostasie endothéliale.

En dehors des cellules endothéliales qui constituent la barrière protectrice des capillaires cérébraux et dont l'activation initie la réaction inflammatoire locale, les monocytes jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire précoce à l'infection par *P. falciparum*. Ces derniers sont capables de limiter la parasitémie par phagocytose et d'orienter la réponse inflammatoire et oxydante. Ainsi, le deuxième volet de ma thèse porte sur l'étude de la réponse monocyttaire des patients présentant un neuropaludisme. Les changements dans les sous-populations de monocytes au cours de l'infection palustre ont été caractérisés en comparant les pourcentages des sous-populations monocytaires entre les deux groupes cliniques UM et CM, ainsi qu'au cours du temps pour les CM à J0, J3 et J30. La diminution du pourcentage de monocytes non-classiques dans le sang périphérique était nette à J0 et J3, comparativement à J30 et aux monocytes du groupe UM. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de *Royo et al* qui avaient montré sur une cohorte d'enfants béninois souffrant de paludisme simple, d'anémie sévère palustre, ou de neuropaludisme, que la diminution du pourcentage de monocytes non-classiques dans le sang périphérique était associée au neuropaludisme et à la survenue du décès

(183). *Dobbs et al* ont aussi obtenu des résultats similaires chez des enfants atteints de paludisme simple en comparaison à des enfants sains du même âge (178). Les monocytes non-classiques sont décrits comme impliqués dans la réparation tissulaire (289). Il est donc possible qu'ils aient migré du sang périphérique vers le cerveau pour assurer leur fonction. Les monocytes non classiques présentent des propriétés de patrouilleurs et sont connus pour être impliqués dans la résolution de l'inflammation lors de pathologies non infectieuses (175), ce qui soutient l'hypothèse de la mobilisation des monocytes non-classiques du sang périphérique vers les sites de séquestration parasitaire, et plus spécifiquement dans les capillaires cérébraux dans le cas du CM pour la résolution de la neuroinflammation. Des modèles murins ont aussi permis de décrire les monocytes Ly6C^{low} comme des monocytes patrouillant à la surface de l'endothélium vasculaire pour coordonner sa réparation si nécessaire ; ces cellules sont également connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires avec une capacité de production d'IL-10 et de polarisation M2 (290).

Concernant la fonctionnalité des monocytes, une perte de la capacité de phagocytose des monocytes totaux a été observée au cours de la phase aiguë du neuropaludisme (CM J0) et 3 jours après inclusion (CM J3) par rapport aux monocytes des mêmes enfants collectés 30 jours après le traitement (CM J30). Ces résultats suggèrent que des facteurs parasitaires ou de l'hôte influencent la phagocytose des GRi. Cette perte de capacité phagocytaire des monocytes pourrait s'expliquer par la présence d'hémozoïne dans ces derniers. L'hémozoïne, le produit final de la digestion de l'hémoglobine par les parasites, est connue pour ses activités immunomodulatrices, notamment l'altération de la phagocytose (291,292). L'hémozoïne, une fois ingérée, ne peut pas être dégradée dans les phagocytes entraînant une altération de leur fonction phagocytaire. Une étude réalisée chez des enfants ougandais souffrant soit de paludisme simple soit de paludisme sévère a montré une corrélation négative entre la présence de monocytes pigmentés dans le sang et la protection contre le paludisme sévère (293). De plus, dans une autre étude, la présence de pigments malariques dans les monocytes et les neutrophiles était un marqueur de la gravité de la maladie et démontre que les neutrophiles pigmentés sont associés au paludisme cérébral et au décès chez les enfants atteints de paludisme grave (294). De même, les monocytes qui ont phagocyté des pigments d'hémozoïne ont été associés à un paludisme grave chez les enfants et à un faible poids à la naissance dans le cas du paludisme placentaire (295). L'analyse post-mortem d'organes infectés par *P. falciparum* a montré la présence de macrophages chargés d'hémozoïne (291). De plus, il a été démontré que les interactions CD47-SIRP α régulaient négativement la phagocytose des macrophages des globules rouges dans les modèles murins et qu'un traitement à base

d'anticorps anti-CD47 augmentait significativement la clairance des globules rouges (296). Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'hémozoïne active la mobilisation de CD47 et l'inhibition de la phagocytose qui en résulte.

Dans notre étude, la perte de capacité phagocytaire est aussi présente au niveau de chaque sous-population monocyttaire. Malgré la diminution de la capacité de phagocytose des sous-populations monocytaires, les monocytes non-classiques restent la sous-population qui présente la meilleure capacité de phagocytose quel que soit le groupe clinique ou le jour de suivi pour les CM. La restauration de leur capacité de phagocytose à J30 suggère qu'une levée de cette inhibition pourrait faciliter la résolution du neuropaludisme.

En accord avec nos résultats, des études antérieures ont rapporté des associations similaires. **Dobbs et al** ont montré que les monocytes intermédiaires et non classiques provenant d'enfants kenyans atteints de paludisme simple avaient une activité phagocytaire supérieure à celle des monocytes classiques, tant pour la phagocytose opsonique que non opsonique (184). Cependant, en utilisant du sang total provenant de personnes saines co-cultivé avec des lignées de *P. falciparum* de laboratoire opsonisées par des anticorps, **Zhou et al** ont découvert que les monocytes intermédiaires avaient une meilleure activité de phagocytose opsonique que celle des autres sous-populations de monocytes (297). Nos résultats vont aussi dans le même sens que ceux de **Garcia-Senosiain et al** qui ont également trouvé une capacité de phagocytose opsonique plus élevée pour les monocytes intermédiaires et non classiques provenant de sujets sains par rapport aux monocytes classiques, avec une supériorité non significative des non-classiques. Fait intéressant, leur étude a également montré que les monocytes classiques étaient néanmoins les plus gros contributeurs à la phagocytose opsonique, parmi les 3 sous-populations, en raison de leur nombre absolu beaucoup plus élevé que les deux autres sous-populations (298). Nous avons obtenu le même résultat pour la phagocytose opsonique et non opsonique dans les deux groupes cliniques étudiés, UM et CM, ainsi qu'au cours du suivi dans le groupe CM. **Mukherjee et al** ont montré que les monocytes non-classiques présentaient des caractéristiques "inflammatoires" et des propriétés de présentation d'antigènes lors de leur activation par du LPS (299).

Bien que certains auteurs aient expliqué la diminution de la capacité de phagocytose des monocytes par l'ingestion d'hémozoïne (292), nous pensons qu'il est possible que *P. falciparum* utilise des mécanismes pour moduler les réponses immunitaires de l'hôte et échapper à la phagocytose. Nous avons donc voulu comprendre les mécanismes moléculaires à la base de la diminution de la capacité de phagocytose des monocytes. Pour cela, les niveaux

d'expression des gènes des monocytes impliqués dans le mécanisme de phagocytose et de modulation de la réponse immunitaire vis-à-vis de *Plasmodium* ont été comparés entre groupes cliniques (CM et UM) et entre points de suivi (J0, J3 et J30). Nous avons constaté que comparé aux enfants UM, la sous-expression *CD16*, *TLR2*, *CR1*, *CR3* et *Tim3* par les monocytes totaux à l'inclusion était associée au neuropaludisme avec une normalisation de l'expression de ces marqueurs à des niveaux similaires à ceux des UM à la phase de guérison (J30). Pour *CD16*, *CR1* et *CR3*, trois récepteurs impliqués dans l'opsonisation, de tels profils d'expression sont cohérents avec la capacité de phagocytose opsonique inférieure des monocytes que nous avons trouvée et suggèrent un effet immunosuppresseur du neuropaludisme, comme **Mandala et al** ont conclu dans leur étude (300). Fait intéressant, dans notre étude, l'expression de *CR3* était inversement liée à la capacité de phagocytose non-opsonique des monocytes à J30 chez les enfants CM. Ce résultat suggère un équilibre entre phagocytose opsonique et non-opsonique qui pourrait être contrôlé en partie par l'expression de *CR3*, en l'absence ou en cas de faible niveau d'immunité, comme dans le cas des enfants de notre cohorte.

De façon surprenante, le transcrite *CD36* n'a montré aucune différence d'expression entre les monocytes des enfants souffrant de neuropaludisme ou de paludisme simple. Le récepteur *CD36* est connu pour son rôle dans la phagocytose non-opsonique des GRi par *P. falciparum*. Bien que nous ayons constaté une diminution de la capacité de phagocytose non-opsonique des monocytes dans notre étude, le gène *CD36* n'a montré aucune différence d'expression. Une étude de l'expression du récepteur *CD36* sur les monocytes d'enfants de la même cohorte que la nôtre (NeuroCM) montre de faibles niveaux d'expression du récepteur *CD36* chez les enfants pendant la phase aiguë du neuropaludisme (J0) en comparaison aux enfants UM (14).

Concernant le récepteur Toll *TLR2*, connu pour son interaction avec le glycosylphosphatidylinositol (GPI) de *P. falciparum* et l'activation subséquente de la réponse inflammatoire (301), bien que nous ayons trouvé des niveaux d'expression similaires entre les groupes CM et UM, un profil d'augmentation a été observé de J3 à J30 dans le groupe CM, suggérant une inhibition durant les premiers jours de CM. **Mandala et al** ont également étudié l'expression de *TLR2* à la surface des monocytes totaux d'enfants malawites présentant un paludisme simple, une anémie palustre sévère et un neuropaludisme et lors de leur guérison (4 semaines plus tard). Ils ont constaté une expression plus faible de *TLR2* dans les groupes d'anémie palustre sévère et de neuropaludisme par rapport aux témoins sains (300). En revanche, **Dobbs et al** ont trouvé une expression élevée de *TLR2* sur les monocytes intermédiaires d'enfants kenyans atteints de paludisme simple par rapport aux enfants en bonne santé (184).

Dans notre étude, Tim3 et LILRB2 avaient un profil d'expression génique opposé par les monocytes du groupe CM au fil du temps. Alors que l'expression de LILRB2 semblait diminuer avec le temps celle de Tim3 augmentait, suggérant peut-être un équilibre entre ces deux gènes dans la régulation de l'effet immunosuppresseur. Cependant, LILRB1, LILRB2 et Tim3 se sont tous révélés inversement liés à la capacité de phagocytose non-opsonique des monocytes du groupe CM à J30. La même relation a été trouvée pour Tim3 exprimé par les monocytes des enfants présentant un paludisme simple (UM). Ces résultats ne confortent pas notre première hypothèse et pointent plutôt vers des fonctions inhibitrices de ces trois récepteurs en relation avec la phagocytose des monocytes. Nos résultats suggèrent également un rôle de LILRB1 et LILRB2 dans la régulation de la phagocytose opsonique des monocytes.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives en termes de stratégies thérapeutiques efficaces pour la résolution de la neuroinflammation. Les monocytes non-classiques apparaissent comme la sous-population monocyttaire la plus efficace dans la phagocytose tant opsonique que non-opsonique. Des taux élevés de monocytes non-classiques dans la circulation sanguine et sur les sites de séquestration parasitaire (les microvaisseaux cérébraux) pourraient permettre une meilleure clairance parasitaire et une meilleure réparation des lésions cérébrales. Il serait également intéressant de tester si l'inhibition de LILRB1 et LILRB2 pourrait participer au rétablissement de la capacité de phagocytose des monocytes.

Le troisième et dernier volet de ma thèse porte sur l'identification des facteurs prédictifs de décès ou de survie au cours du neuropaludisme. A ce jour, la cinétique des mécanismes physiopathologiques conduisant au développement du neuropaludisme est encore mal comprise. La cytoadhérence des GRi aux cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux cause non seulement une obstruction vasculaire mais aussi l'activation des cellules endothéliales. Ces cellules activées vont sécréter des cytokines/chémokines qui entraînent le recrutement de plaquettes et de cellules immunitaires telles que les monocytes, les lymphocytes et les neutrophiles dans le cerveau (302). Il s'en suit alors un processus inflammatoire local qui conduit à l'altération de la BHE (156). Dans ce contexte, la production croissante de cytokines/chémokines et d'autres acteurs de la réponse inflammatoire et oxydative en réponse à la neuroinflammation joue un rôle majeur au cours du neuropaludisme, participant à la fois à l'amplification du phénomène de neuroinflammation et à sa résolution. Un ajustement de la cinétique de production de cytokines/chémokines et d'autres marqueurs immunitaires est donc nécessaire pour la résolution de la neuroinflammation. Dans cette dernière partie de ma thèse, nous avons étudié des variables plus spécifiques des réponses inflammatoires et oxydatives

afin d'identifier les facteurs de risque de décès suite au neuropaludisme et d'améliorer notre compréhension de la pathogenèse du neuropaludisme. A cet effet, des biomarqueurs plasmatiques et urinaires ont été mesurés à J0 chez les enfants souffrant de neuropaludisme et à J3 puis à J30 chez les enfants ayant survécu au neuropaludisme.

Parmi les biomarqueurs plasmatiques mesurés, l'analyse univariée révèle que les taux de TNF, IL-8, IL-1 β , IL-10, CXCL9, granzyme B et angiopoïétine-2 mesurés à la phase aiguë (J0) étaient plus élevés chez les enfants décédés de neuropaludisme que chez ceux qui ont survécu. Pour les médiateurs urinaires, des niveaux plus faibles de PGEM à J0 ont été associés au décès. Cependant, seul un niveau initial plus élevé d'IL-8 plasmatique a été identifié comme un facteur de risque de décès par l'analyse multivariée. Les taux plasmatiques et urinaires mesurés pendant la convalescence (J3 et J30) ont confirmé ces tendances et suggèrent deux types de profils de marqueurs : un profil de sévérité de la maladie pour des marqueurs décroissants de J0 à J30 incluant pour les marqueurs plasmatiques le TNF, l'IL-8, l'IL-10, le CXCL9, granzyme B, l'angiopoïétine-2, ainsi que l'IL-6, CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, et ICAM-1. Pour les marqueurs urinaires, la créatinine, la GSH et le ratio GSH:GSSG présentaient aussi ce profil de sévérité. Un profil dit de résolution de la maladie, qui correspondait à l'augmentation des marqueurs de J0 à J30, a été trouvé pour les niveaux de CXCL5, CCL17, et CCL22 plasmatiques, et de PGEM, 15-F2t-isoprostane, LTB4, LXA4, et GSSG urinaires. Il est important de rappeler que les valeurs obtenues à J3 et J30 appartiennent toutes à des enfants survivants, tous les décès étant survenus avant J3.

En accord avec nos résultats, des études antérieures ont montré des associations entre la gravité du paludisme ou le décès, les cytokines pro-inflammatoires et la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (303–306). Au cours du neuropaludisme, les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF et l'IL-1 β induiraient une activation endothéliale, comme cela a été démontré *in vitro* (307,308), et joueraient un rôle majeur dans la séquestration des GRi dans les micro-vaisseaux cérébraux (309) par la surexpression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM), l'accumulation de cellules T CD8+ cytotoxiques et l'altération de la BHE (310,311). Une augmentation de l'IL-1 β plasmatique ainsi que de l'IL-10 et du TNF a également été associée à l'évolution du neuropaludisme (312). Il a été démontré chez la souris que l'absence d'expression d'IL-10 était associée au développement d'un paludisme grave et à une surmortalité, ce qui suggère un rôle protecteur de cette cytokine (313,314), tandis que des taux plasmatiques élevés d'IL-10 chez l'homme étaient corrélés à la gravité du paludisme et au décès (183,311,315). Nos résultats sont en accord avec la plupart des études menées chez l'homme qui suggèrent un rôle de l'IL-10 plasmatique élevé dans la gravité du paludisme et le décès lié au CM.

Dans nos résultats, des taux plasmatiques élevés d'IL-8 (≥ 57.5 pg/mL) apparaissent fortement associés à la survenue du décès suite à un neuropaludisme. L'étude de la cinétique montre une rapide diminution de l'IL-8 plasmatique à J3 et J30 chez les enfants ayant survécu. D'autres études ont également fait état d'une association significative entre des niveaux élevés d'IL-8 dans le plasma ou le sérum et la gravité ou le décès dans les cas de paludisme grave (anémie palustre sévère ou neuropaludisme) (316,317). **Pappa et al** ont montré une corrélation positive et significative entre les niveaux d'IL-8 dans le plasma et le volume cérébral chez les enfants atteints de neuropaludisme (318). Une telle corrélation a également été observée pour le TNF, le CCL2 et l'IL-10, conformément à nos résultats. Il est intéressant de noter que des taux élevés d'IL-8 cérébrospinal, mais pas des taux sériques d'IL-8, ont été identifiés comme un marqueur de décès dû au neuropaludisme chez les enfants décédés de neuropaludisme, d'anémie sévère palustre ou d'autres causes que le paludisme (319). L'IL-8 est une chimiokine connue pour favoriser l'activation des neutrophiles et leur migration vers les sites d'inflammation. Les neutrophiles, une fois activés, produisent également de l'IL-8, ce qui renforce ainsi l'inflammation. Nos résultats suggèrent l'implication des neutrophiles dans la pathogenèse du neuropaludisme. Cette implication paraît évidente d'autant plus que les neutrophiles en plus de participer à la réponse de l'hôte contre *Plasmodium* à travers la phagocytose, génèrent un stress oxydatif par la production de ROS (268). Les neutrophiles libèrent aussi des médiateurs toxiques tels que les pièges extracellulaires à neutrophiles (NETs), conduisant à une altération de l'endothélium cérébral et à une augmentation de la séquestration des GRi (320). **Knackstedt et al** ont montré chez des patients mozambicains atteints de paludisme grave (SMA et CM) que les niveaux plasmatiques de NETs étaient plus élevés en comparaison aux patients sains, et qu'ils favorisaient la séquestration des parasites et les lésions tissulaires (320), confirmant ainsi l'importance de l'activation des neutrophiles dans la pathogenèse du neuropaludisme. De plus, les produits libérés par les neutrophiles, tels que l'élastase, crée des lésions au niveau de l'endothélium (321,322), tandis que le TNF- α et les ROS augmentent l'expression d'ICAM-1 sur les cellules endothéliales favorisant ainsi l'adhésion des parasites (323,324). En outre, dans notre étude, un profil de résolution de la maladie était associé à des taux croissants de CXCL5 obtenus de J0 à J30 chez les enfants survivants. CXCL5 est une chimiokine impliquée dans le trafic des neutrophiles (325). Outre le rôle bénéfique des neutrophiles dans l'élimination de *Plasmodium*, il est urgent d'étudier leur implication dans la pathogenèse des cas graves de paludisme et les voies de signalisation qui les activent. L'identification et la compréhension des

interactions entre les neutrophiles et *P. falciparum* pourraient aboutir à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et justifient des recherches plus approfondies.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La pathogenèse du neuropaludisme est décrite comme un mécanisme en plusieurs étapes. Dans ce contexte, les cellules endothéliales et les monocytes ont été impliqués dans la pathogenèse du neuropaludisme soit en favorisant la séquestration des globules rouges infectés dans les microvaisseaux cérébraux soit en participant à la réponse pro-inflammatoire excessive de l'hôte. Dans le cas de la neuroinflammation, l'activation endothéliale est suivie d'un recrutement des monocytes sur le site de séquestration parasitaire. Malgré les avancées majeures récentes sur le vaccin antipaludique, le paludisme sévère, dont le neuropaludisme, est encore un problème majeur en Afrique subsaharienne pour les enfants de moins de 5 ans. Pour améliorer la prise en charge de cette pathologie sévère, l'une des pistes consiste à comprendre les interactions hôte-parasites et les mécanismes de défense mis en œuvre par l'hôte au cours du neuropaludisme, ce qui pourrait permettre la conception de nouveaux agents immunothérapeutiques. Au cours de cette thèse, mes travaux étaient centrés sur l'étude au cours du neuropaludisme des mécanismes d'activation des cellules endothéliales, la fonctionnalité des sous-populations monocytaires et l'identification de biomarqueurs prédictifs du risque de neuropaludisme et de décès. Les résultats nous ont permis d'aboutir aux résultats principaux suivants.

L'étude des interactions entre les isolats parasitaires et les cellules endothéliales Hbec-5i révèle une surexpression du gène *nrf2* par les cellules endothéliales en présence de globules rouges infectés par des isolats de patients neuropaludisme par rapport à des isolats de paludisme simple, et ce que les cellules soient en contact ou non. Cependant, le contact entre les cellules augmentait cette expression, soulignant l'impact de la cytoadhérence sur l'expression de *nrf2*. S'agissant des gènes *nf-Kβ*, *fadd* et *pparγ*, leurs niveaux d'expression par les cellules endothéliales étaient plus élevés en présence d'isolats issus d'enfants souffrant d'un neuropaludisme par rapport à des isolats de paludisme simple, sans différence que les cellules soient en contact ou non, suggérant que des facteurs solubles parasitaires sont suffisants à l'activation de l'expression de ces 3 gènes par l'endothélium vasculaire. Au contraire, pour les gènes *inos* et *vegfa*, leurs niveaux d'expression par les cellules HBEC-5i étaient augmentés suite à l'adhésion des isolats issus d'enfants souffrant d'un neuropaludisme, l'absence de contact entre cellules endothéliales et globules rouges ne permettant pas d'influencer le niveau d'expression de ces gènes. Le dosage des cytokines/chemokines dans les surnageants de co-culture n'a montré aucune différence significative selon le type d'isolat clinique utilisé (CM et UM), suggérant que la sécrétion de ces médiateurs par les cellules endothéliales ne repose pas

seulement sur la cytoadhérence/séquestration des formes matures de globules rouges infectés dans les microvaisseaux. Cependant, il est nécessaire de confirmer cette hypothèse avec différents modèles de co-culture à savoir : Hbec-5i avec isolats parasitaires pendant 24 ou 48H, Hbec-5i avec surnageants de culture d'isolats parasitaires pendant 24 ou 48H, Hbec-5i avec plasmas d'enfants souffrant soit de paludisme simple soit de neuropaludisme pendant 24 ou 48H.

Concernant la réponse monocyttaire au cours du neuropaludisme, une diminution des pourcentages de monocytes non-classiques dans le sang périphérique était associée à la phase aiguë du neuropaludisme (J0), ainsi qu'à J3, suggérant leur possible migration du sang périphérique vers le cerveau pour assurer leur fonction de « réparation tissulaire ». L'étude de la fonctionnalité des monocytes révèle une association entre la perte de la capacité de phagocytose des monocytes totaux et la phase aiguë du neuropaludisme (J0), ainsi qu'à J3, suggérant une inhibition de la capacité de phagocytose des monocytes au cours de la neuroinflammation. Cette inhibition pourrait être due à l'ingestion de l'hémozoïne par les monocytes, les rendant ainsi inaptes à la phagocytose. Malgré cette diminution de capacité de phagocytose des monocytes totaux, nos travaux ont montré que les monocytes non-classiques étaient la sous-population monocyttaire présentant la meilleure capacité de phagocytose que ce soit pendant la phase aiguë du neuropaludisme, 3 jours après traitement et à la guérison (30 jours après traitement), suggérant leur implication dans la résolution de la neuroinflammation. L'étude génique des monocytes totaux d'enfants de cette étude a montré l'implication des récepteurs inhibiteurs LILRB1, LILRB2 et Tim3 dans le contrôle de la phagocytose. Dans cette étude, nous avons uniquement mesuré les niveaux de transcription de l'ARNm, il serait intéressant de mener une étude qui prend en compte la régulation post-traductionnelle de l'ARNm et la régulation du niveau de protéine des molécules discutées. D'autres études portant sur de potentiels mécanismes susceptibles de moduler le profil transcriptionnel des monocytes pourraient aider à faire évoluer les monocytes classiques en non-classiques au cours de phase aiguë du neuropaludisme en vue d'une résolution plus rapide de la neuroinflammation. Des études récentes ont utilisé des souris déficientes en monocytes et ont permis de démontrer que les monocytes jouent un rôle important dans la pathogenèse du neuropaludisme. L'utilisation d'un modèle murin déficient en monocytes non classiques (souris Nr4a1^{-/-}) pourrait également confirmer le rôle des monocytes non-classiques dans la résolution de la neuroinflammation. Une possibilité intéressante pour l'avenir consiste à comparer les transcriptomes des monocytes de patients (RNAseq) avec ceux des isolats parasitaires des mêmes patients au cours de la phase

aiguë et à la guérison pour mieux caractériser les moteurs moléculaires des différents états immunitaires.

Pour finir, une identification des facteurs prédictifs de décès ou de survie au cours du neuropaludisme a été effectuée dans les plasmas et urine des enfants de notre cohorte. Il en résulte que les taux de TNF, IL-8, IL-1 β , IL-10, CXCL9, granzyme B et angiopoïétine-2 mesurés à la phase aiguë (J0) étaient plus élevés chez les enfants décédés de neuropaludisme que chez ceux qui ont survécu. Un taux plasmatique élevé d'IL-8 a été identifié comme un facteur de risque de décès par l'analyse multivariée. De plus, l'étude de la cinétique montre une rapide diminution de l'IL-8 plasmatique à J3 et J30 chez les enfants ayant survécu. L'IL8 étant une chimiokine sécrétée par les neutrophiles et connue pour favoriser l'activation des neutrophiles et leur migration vers les sites d'inflammation, nos résultats montrent l'implication des neutrophiles dans la pathogenèse du neuropaludisme. Des études approfondies pour la compréhension des interactions entre les neutrophiles et *P. falciparum* pourraient donc aboutir à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans l'ensemble, nos résultats permettent de mieux comprendre les interactions entre les monocytes, les cellules endothéliales et *P. falciparum* dans la pathogénicité du neuropaludisme

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Shrestha B, Shah Z, Morgan AP, Saingam P, Chaisatit C, Chaorattanakawee S, et al.** Distribution and temporal dynamics of *P. falciparum* chloroquine resistance transporter mutations associated with piperazine resistance in Northern Cambodia. *J Infect Dis* (2021) doi: 10.1093/infdis/jiab055
2. **World Health Organization.** World malaria Report. (2023). (Geneva: WHO). Available at: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023> (Accessed December 29, 2023).
3. **World Health Organization.** World malaria Report. (2022). (Geneva: WHO). Available at: <https://www.who.int/fr/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2022> (Accessed December 29, 2023).
4. **Wassmer SC, Taylor TE, Rathod PK, Mishra SK, Mohanty S, Arevalo-Herrera M, et al.** Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. *Am J Trop Med Hyg* (2015) 93:42–56. doi: 10.4269/ajtmh.14-0841
5. **Storm J, Camarda G, Haley MJ, Brough D, Couper KN, Craig AG.** Plasmodium falciparum-infected erythrocyte co-culture with the monocyte cell line THP-1 does not trigger production of soluble factors reducing brain microvascular barrier function. *PloS One* (2023) 18:e0285323. doi: 10.1371/journal.pone.0285323
6. **Buçşan AN, Williamson KC.** Setting the stage: The initial immune response to blood-stage parasites. *Virulence* (2020) 11:88–103. doi: 10.1080/21505594.2019.1708053
7. **Ortega-Pajares A, Rogerson SJ.** The rough guide to monocytes in malaria infection. *Front Immunol* (2018) 9:2888. doi: 10.3389/fimmu.2018.02888
8. **Malaria.** (2023) Available at: <https://www.wanda.be/fr/a-z-index/malaria/> (Accessed May 13, 2023)
9. **Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N, et al.** Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *Jama* (2010) 303:638–647. doi: 10.1001/jama.2010.121
10. **Hussin N, Lim YA-L, Goh PP, William T, Jelip J, Mudin RN.** Updates on malaria incidence and profile in Malaysia from 2013 to 2017. *Malar J* (2020) 19:55. doi: 10.1186/s12936-020-3135-x
11. **Barnett R.** Malaria. *The Lancet* (2016) 387:2495. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30799-1
12. **Schlagenhauf P.** Malaria: from prehistory to present. *Infect Dis Clin North Am* (2004) 18:189–205. doi: 10.1016/j.idc.2004.01.002
13. **Cunha CB, Cunha BA.** Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J vector borne dis* (2008) 45:194–199.
14. **Royo J.** Identification des facteurs immunitaires impliqués dans la neuroinflammation et sa résolution, dans un contexte de paludisme cérébral: rôle des réponses monocytaires. Thèse de doctorat (2021). Available at: <https://www.theses.fr/2021TOU30059> (Accessed May 13, 2023)

15. **Riley EM, Schneider G, Sambou I, Greenwood BM.** Suppression of cell-mediated immune responses to malaria antigens in pregnant gambian women. *Am J Trop Med Hyg* (1989) 40:141–144. doi: 10.4269/ajtmh.1989.40.141
16. **Dellicour S, Tatem A, Guerra C, Snow R, ter Kuile F.** Quantifying the number of pregnancies at risk of malaria in 2007: a demographic study. *PLoS med* (2010) 7:e1000221. doi: 10.1371/journal.pmed.1000221
17. **Mwangoka GW, Kimera SI, Mboera LE.** Congenital Plasmodium falciparum infection in neonates in muheza district, tanzania. *Malar J* (2008) 7:117. doi: 10.1186/1475-2875-7-117
18. **Uneke CJ.** Congenital Plasmodium falciparum malaria in sub-saharan Africa: a rarity or frequent occurrence? *Parasitol Res* (2007) 101:835–842. doi: 10.1007/s00436-007-0577-9
19. **Enweronu-Laryea CC, Adjei GO, Mensah B, Duah N, Quashie NB.** Prevalence of congenital malaria in high-risk Ghanaian newborns: a cross-sectional study. *Malar J* (2013) 12:17. doi: 10.1186/1475-2875-12-17
20. **Schumacher R-F, Spinelli E.** Malaria in Children. *Mediterr J Hematol Infect Dis* (2012) 4: doi: 10.4084/MJHID.2012.073
21. Prevalence of Malaria and Some Opportunistic Infections in Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome (HIV/AIDS) Patients with CD4 Below 200 in Faith Alive Hospital, Jos, Plateau State, Nigeria. Available at: <https://www.clinmedjournals.org/articles/ijva/international-journal-of-virology-and-aids-ijva-7-058.php?jid=ijva> (Accessed June 30, 2023)
22. **Rubaihayo J, Tumwesigye NM, Konde-Lule J, Wamani H, Nakku-Joloba E, Makumbi F.** Frequency and distribution patterns of opportunistic infections associated with HIV/AIDS in Uganda. *BMC Res Notes* (2016) 9:501. doi: 10.1186/s13104-016-2317-7
23. **Enuma JN, Sanni FO, Matur MB, Jean NE, Erhabor T, Egbulefu II.** Malaria an opportunistic infection in HIV/AIDS patients? – A Nigerian experience. *Afr J Lab Med* (2022) 11:1842. doi: 10.4102/ajlm.v11i1.1842
24. **Färnert A, Wyss K, Dashti S, Naucler P.** Duration of residency in a non-endemic area and risk of severe malaria in African immigrants. *Clin Microbiol Infect* (2015) 21:494–501. doi: 10.1016/j.cmi.2014.12.011
25. **Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al.** Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *The Lancet* (2012) 379:413–431. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60034-8
26. **Ozen M, Gungor S, Atambay M, Daldal N.** Cerebral malaria owing to Plasmodium vivax: case report. *Ann Trop Paediatr* (2006) 26:141–144. doi: 10.1179/146532806X107494
27. **Tanwar GS, Khatri PC, Sengar GS, Kochar A, Kochar SK, Middha S, et al.** Clinical profiles of 13 children with Plasmodium vivax cerebral malaria. *Ann Trop Paediatr* (2011) 31:351–356. doi: 10.1179/1465328111Y.0000000040
28. **Cowman AF, Crabb BS.** Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* (2006) 124:755–766.

29. Cell Structure of Plasmodium Falciparum. Available at: <http://sites.gsu.edu/bdavis72/2019/04/10/cell-structure-of-plasmodium-falciparum/> (Accessed June 30, 2023)
30. **World Health Organization.** World malaria Report. (2019). (Geneva: WHO). Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721> (Accessed May 21, 2023)
31. **Weiland AS.** Recent advances in imported malaria pathogenesis, diagnosis, and management. *Curr Emerg Hosp Med Rep* (2023) 11:49–57. doi: 10.1007/s40138-023-00264-5
32. **Lo E, Yewhalaw D, Zhong D, Zemene E, Degefa T, Tushune K, et al.** Molecular epidemiology of Plasmodium vivax and Plasmodium falciparum malaria among Duffy-positive and Duffy-negative populations in Ethiopia. *Malar J* (2015) 14:84. doi: 10.1186/s12936-015-0596-4
33. **Trivedi S, Chakravarty A.** Neurological complications of malaria. *Curr Neurol Neurosci Rep* (2022) 22:499–513. doi: 10.1007/s11910-022-01214-6
34. Kochar DK, Saxena V, Singh N, Kochar SK, Kumar SV, Das A. Plasmodium vivax malaria. *Emerg Infect Dis* (2005) 11:132–134. doi: 10.3201/eid1101.040519
35. **Centers for Disease Control and Prevention.** CDC - Malaria - Biology. (2020). Available at: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html> (Accessed May 21, 2023)
36. **Rifakis PM, Hernandez O, Fernández CT, Rodriguez-Morales AJ, Von A, Franco-Paredes C.** Atypical Plasmodium vivax malaria in a traveler: bilateral hydronephrosis, severe thrombocytopenia, and hypotension. *J Travel Med* (2008) 15:119–121.
37. **World Health Organization.** Guidelines for the treatment of malaria (3rd ed). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294440/> (Accessed May 25, 2023)
38. **Collins WE, Jeffery GM.** Plasmodium ovale: parasite and disease. *Clin Microbiol Rev* (2005) 18:570–581.
39. **Durante Mangoni E, Severini C, Menegon M, Romi R, Ruggiero G, Majori G.** Case report: An unusual late relapse of Plasmodium vivax malaria. *Am J Trop Med Hyg* (2003) 68:159–160.
40. **Collins WE, Jeffery GM.** Plasmodium malariae: Parasite and Disease. *Clin Microbiol Rev* (2007) 20:579–592.
41. **Sendor R, Banek K, Kashamuka MM, Mvuama N, Bala JA, Nkalani M, et al.** Epidemiology of Plasmodium malariae and Plasmodium ovale spp. in Kinshasa Province, Democratic Republic of Congo. *Nat Commun* (2023) 14:6618. doi: 10.1038/s41467-023-42190-w
42. **Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SSG, Cox-Singh J, et al.** A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet Lond Engl* (2004) 363:1017–1024. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15836-4
43. **Zaw MT, Lin Z.** Human Plasmodium knowlesi infections in South-East Asian countries. *J Microbiol Immunol Infect* (2019) 52:679–684. doi: 10.1016/j.jmii.2019.05.012

44. **Davidson G, Chua TH, Cook A, Speldewinde P, Weinstein P.** The Role of ecological linkage mechanisms in plasmodium knowlesi transmission and spread. *EcoHealth* (2019) 16:594–610. doi: 10.1007/s10393-019-01395-6
45. **World Health Organization.** Paludisme - Principaux repères. Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>. (Accessed June 25, 2023)
46. **Chuang H, Sakaguchi M, Lucky AB, Yamagishi J, Katakai Y, Kawai S, et al.** SICA-mediated cytoadhesion of Plasmodium knowlesi-infected red blood cells to human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep* (2022) 12:14942. doi: 10.1038/s41598-022-19199-0
47. **Grigg MJ, William T, Barber BE, Parameswaran U, Bird E, Piera K, et al.** Combining parasite lactate dehydrogenase-based and histidine-rich protein 2-based rapid tests to improve specificity for diagnosis of malaria Due to Plasmodium knowlesi and other Plasmodium species in Sabah, Malaysia. *J Clin Microbiol* (2014) 52:2053–2060. doi: 10.1128/JCM.00181-14
48. Malaria vector species. Available at: <https://anobase.org/species/MalariaSpecies.html> (Accessed May 23, 2023)
49. **N'Dri BP, Wipf NC, Saric J, Fodjo BK, Raso G, Utzinger J, et al.** Species composition and insecticide resistance in malaria vectors in Ellibou, southern Côte d'Ivoire and first finding of Anopheles arabiensis in Côte d'Ivoire. *Malar J* (2023) 22:93. doi: 10.1186/s12936-023-04456-y
50. **Alenou LD, Nwane P, Mbakop LR, Pameu M, Ekoko W, Mandeng S, et al.** Burden of mosquito-borne diseases across rural versus urban areas in Cameroon between 2002 and 2021: prospective for community-oriented vector management approaches. *Parasit Vectors* (2023) 16:136. doi: 10.1186/s13071-023-05737-w
51. **Carnevale P, Robert V eds.** Les anophèle : Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. *IRD Éditions* (2017). p. 47–86 doi: 10.4000/books.irdeditions.10389
52. Anopheles gambiae strain KISUMU preserved or extracts. Available at: <https://infravec2.eu/product/anopheles-gambiae-strain-kisumu-preserved-or-extracts/> (Accessed June 30, 2023)
53. Anopheles Darlingi - an overview . Available at: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/anopheles-darlingi> (Accessed June 30, 2023)
54. Anopheles stephensi strain AF-SDA500 infected with Plasmodium falciparum. Available at: <https://infravec2.eu/product/anopheles-stephensi-strain-af-sda500-infected-with-plasmodium-falciparum/> (Accessed June 30, 2023)
55. **Aguiar R, Magallon-Tejada A, Achtman AH, Moraleta C, Joice R, Cisteró P, et al.** Molecular evidence for the localization of Plasmodium falciparum immature gametocytes in bone marrow. *Blood* (2014) 123:959–966. doi: 10.1182/blood-2013-08-520767
56. **Joice R, Nilsson SK, Montgomery J, Dankwa S, Egan E, Morahan B, et al.** Plasmodium falciparum transmission stages accumulate in the human bone marrow. *Sci Transl Med* (2014) 6:244re5. doi: 10.1126/scitranslmed.3008882

57. **Birkholtz L-M, Coetzer TL, Mancama D, Leroy D, Alano P.** Discovering new transmission-blocking antimalarial compounds: challenges and opportunities. *Trends Parasitol* (2016) 32:669–681. doi: 10.1016/j.pt.2016.04.017
58. **Connacher J, von Grüning H, Birkholtz L.** Histone modification landscapes as a roadmap for malaria parasite development. *Front Cell Dev Biol* (2022) 10:848797. doi: 10.3389/fcell.2022.848797
59. **Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S.** Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol* (2011) 27:442–449. doi: 10.1016/j.pt.2011.06.004
60. **Milner DA.** Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2018) 8:a025569. doi: 10.1101/cshperspect.a025569
61. Chen I, Clarke SE, Gosling R, Hamainza B, Killeen G, Magill A, et al. “Asymptomatic” malaria: a chronic and debilitating infection that should be treated. *PLoS Med* (2016) 13:e1001942. doi: 10.1371/journal.pmed.1001942
62. **Centers for Disease Control and Prevention.** About Malaria Disease. CDC (2022). Available at: <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html> (Accessed May 27, 2023)
63. **Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K.** Malaria: biology and disease. *Cell* (2016) 167:610–624. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055
64. **White NJ.** Severe malaria. *Malar J* (2022) 21:284. doi: 10.1186/s12936-022-04301-8
65. **Anstey NM, Grigg MJ, Rajahram GS, Cooper DJ, William T, Kho S, Barber BE.** Knowlesi malaria: Human risk factors, clinical spectrum, and pathophysiology. *Adv Parasitol* (2021) 113:1–43. doi: 10.1016/bs.apar.2021.08.001
66. **Albrecht-Schgoer K, Lackner P, Schmutzhard E, Baier G.** Cerebral malaria: current clinical and immunological aspects. *Front Immunol* (2022) 13:863568. doi: 10.3389/fimmu.2022.863568
67. **Luzolo AL, Ngoyi DM.** Cerebral malaria. *Brain Res Bull* (2019) 145:53–58. doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.01.010
68. **Birbeck GL.** Epilepsy care in developing countries: Part II of II. *Epilepsy Curr* (2010) 10:105–110. doi: 10.1111/j.1535-7511.2010.01372.x
69. **Brisset J, Angendu Baki K, Watier L, Kinkpé E, Bailly J, Ayédadjou L, et al.** Non-traumatic coma in young children in Benin: are viral and bacterial infections gaining ground on cerebral malaria? *Infect Dis Poverty* (2022) 11:29. doi: 10.1186/s40249-022-00956-2
70. **Royo J, Vianou B, Accrombessi M, Kinkpé E, Ayédadjou L, Dossou-Dagba I, et al.** Elevated plasma interleukin-8 as a risk factor for mortality in children presenting with cerebral malaria. *Infect Dis Poverty* (2023) 12:8. doi: 10.1186/s40249-023-01059-2
71. **Boström S, Giusti P, Arama C, Persson J-O, Dara V, Traore B, et al.** Changes in the levels of cytokines, chemokines and malaria-specific antibodies in response to Plasmodium falciparum infection in children living in sympatry in Mali. *Malar J* (2012) 11:109. doi: 10.1186/1475-2875-11-109
72. **Wangala B, Vovor A, Gantin RG, Agbeko YF, Lechner CJ, Huang X, et al.** Chemokine levels and parasite- and allergen-specific antibody responses in children

- and adults with severe or uncomplicated Plasmodium falciparum malaria. *Eur J Microbiol Immunol* (2015) 5:131–141. doi: 10.1556/EUJMI-D-14-00041
73. **Desai M, Kuile FO ter, Nosten F, McGready R, Asamo K, Brabin B, et al.** Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet Infect Dis* (2007) 7:93–104. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70021-X
 74. **Zakama AK, Ozarlan N, Gaw SL.** Placental malaria. *Curr Trop Med Rep* (2020) 7:162–171. doi: 10.1007/s40475-020-00213-2
 75. **Tomlinson A, Semblat J-P, Gamain B, Chêne A.** VAR2CSA-mediated host defense evasion of Plasmodium falciparum infected erythrocytes in placental malaria. *Front Immunol* (2020) 11:624126. doi: 10.3389/fimmu.2020.624126
 76. **Chua CLL, Khoo SKM, Ong JLE, Ramireddi GK, Yeo TW, Teo A.** Malaria in Pregnancy: from placental infection to its abnormal development and damage. *Front Microbiol* (2021) 12:777343. doi: 10.3389/fmicb.2021.777343
 77. **Gamain B, Chêne A, Viebig NK, Tuikue Ndam N, Nielsen MA.** Progress and insights toward an effective placental malaria vaccine. *Front Immunol* (2021) 12:634508. doi: 10.3389/fimmu.2021.634508
 78. **Idro R, Karamagi C, Tumwine J.** Immediate outcome and prognostic factors for cerebral malaria among children admitted to Mulago Hospital, Uganda. *Ann Trop Paediatr* (2004) 24:17–24. doi: 10.1179/027249304225013240
 79. **Moxon CA, Grau GE, Craig AG.** Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host. *Br J Haematol* (2011) 154:670–679. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08755.x
 80. **Udeinya IJ, Miller LH, McGregor IA, Jensen JB.** Plasmodium falciparum strain-specific antibody blocks binding of infected erythrocytes to amelanotic melanoma cells. *Nature* (1983) 303:429–431. doi: 10.1038/303429a0
 81. **Leech JH, Barnwell JW, Miller LH, Howard RJ.** Identification of a strain-specific malarial antigen exposed on the surface of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J Exp Med* (1984) 159:1567–1575. doi: 10.1084/jem.159.6.1567
 82. **Langreth SG, Reese RT.** Antigenicity of the infected-erythrocyte and merozoite surfaces in falciparum malaria. *J Exp Med* (1979) 150:1241–1254. doi: 10.1084/jem.150.5.1241
 83. **Su XZ, Heatwole VM, Wertheimer SP, Guinet F, Herrfeldt JA, Peterson DS, et al.** The large diverse gene family var encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Cell* (1995) 82:89–100. doi: 10.1016/0092-8674(95)90055-1
 84. **Smith JD, Chitnis CE, Craig AG, Roberts DJ, Hudson-Taylor DE, Peterson DS, et al.** Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* (1995) 82:101–110. doi: 10.1016/0092-8674(95)90056-x
 85. **Baruch DI, Pasloske BL, Singh HB, Bi X, Ma XC, Feldman M, et al.** Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* (1995) 82:77–87. doi: 10.1016/0092-8674(95)90054-3

86. **Brejt JA, Golightly LM.** Severe malaria: update on pathophysiology and treatment. *Curr Opin Infect Dis* (2019) 32:413–418. doi: 10.1097/QCO.0000000000000584
87. **Song X, Wei W, Cheng W, Zhu H, Wang W, Dong H, et al.** Cerebral malaria induced by plasmodium falciparum: clinical features, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Front Cell Infect Microbiol* (2022) 12:939532. doi: 10.3389/fcimb.2022.939532
88. **Quadt KA, Barfod L, Andersen D, Bruun J, Gyan B, Hassenkam T, et al.** The density of knobs on Plasmodium falciparum-infected erythrocytes depends on developmental age and varies among isolates. *Plos one* (2012) 7:e45658. doi: 10.1371/journal.pone.0045658
89. **Nortey LN, Anning AS, Nakotey GK, Ussif AM, Opoku YK, Osei SA, et al.** Genetics of cerebral malaria: pathogenesis, biomarkers and emerging therapeutic interventions. *Cell Biosci* (2022) 12:91. doi: 10.1186/s13578-022-00830-6
90. **Kim K.** Malaria var gene expression: Keeping up with the neighbors. *Cell Host Microbe* (2012) 11:1–2. doi: 10.1016/j.chom.2012.01.002
91. **Zakama AK, Gaw SL.** Malaria in pregnancy: what the obstetric provider in nonendemic areas needs to know. *Obstet Gynecol Surv* (2019) 74:546–556. doi: 10.1097/OGX.0000000000000704
92. **Clark RL.** Genesis of placental sequestration in malaria and possible targets for drugs for placental malaria. *Birth Defects Res* (2019) 111:569–583. doi: 10.1002/bdr2.1496
93. **Odongo CO, Odida M, Wabinga H, Obua C, Byamugisha J.** Burden of placental malaria among pregnant women who use or do not use intermittent preventive treatment at mulago hospital, Kampala. *Malar Res Treat* (2016) 2016:1839795. doi: 10.1155/2016/1839795
94. **Ponsford MJ, Medana IM, Prapansilp P, Hien TT, Lee SJ, Dondorp AM, et al.** Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *J Infect Dis* (2012) 205:663–671. doi: 10.1093/infdis/jir812
95. **Pongponratn E, Turner GDH, Day NPJ, Phu NH, Simpson JA, Stepniewska K, et al.** An ultrastructural study of the brain in fatal Plasmodium falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* (2003) 69:345–359.
96. **Armah H, Dodoo AK, Wiredu EK, Stiles JK, Adjei AA, Gyasi RK, et al.** High-level cerebellar expression of cytokines and adhesion molecules in fatal, paediatric, cerebral malaria. *Ann Trop Med Parasitol* (2005) 99:629–647. doi: 10.1179/136485905X51508
97. **Kalkal M, Kalkal A, Dhanda SK, Das E, Pande V, Das J.** A comprehensive study of epitopes and immune reactivity among Plasmodium species. *BMC Microbiol* (2022) 22:74. doi: 10.1186/s12866-022-02480-7
98. **Kataria P, Surela N, Chaudhary A, Das J.** MiRNA: Biological regulator in host-parasite interaction during malaria infection. *Int J Environ Res Public Health* (2022) 19:2395. doi: 10.3390/ijerph19042395
99. **Rug M, Prescott SW, Fernandez KM, Cooke BM, Cowman AF.** The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of P. falciparum-infected human erythrocytes. *Blood* (2006) 108:370–378. doi: 10.1182/blood-2005-11-4624
100. **Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al.** Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature* (2002) 419:10.1038/nature01097. doi: 10.1038/nature01097

101. **Rask TS, Hansen DA, Theander TG, Gorm Pedersen A, Lavstsen T.** Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 diversity in seven genomes – divide and conquer. *PLoS Comput Biol* (2010) 6:e1000933. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000933
102. **David S. Peterson, Louis H. Miller, and Thlomas E. Wellems** Isolation of multiple sequences from the Plasmodium falciparum genome that encode conserved domains homologous to those in erythrocyte-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) Vol. 92, pp. 7100-7104, July 1995
103. **Baruch DI, Ma XC, Singh HB, Bi X, Pasloske BL, Howard RJ.** Identification of a region of PfEMP1 that mediates adherence of Plasmodium falciparum infected erythrocytes to CD36: conserved function with variant sequence. *Blood* (1997) 90:3766–3775.
104. **Chitnis CE, Miller LH.** Identification of the erythrocyte binding domains of Plasmodium vivax and Plasmodium knowlesi proteins involved in erythrocyte invasion. *J Exp Med* (1994) 180:497–506. doi: 10.1084/jem.180.2.497
105. **Lennartz F, Adams Y, Bengtsson A, Olsen RW, Turner L, Ndam NT, et al.** Structure-guided identification of a family of dual receptor-binding PfEMP1 that is associated with cerebral malaria. *Cell Host Microbe* (2017) 21:403–414. doi: 10.1016/j.chom.2017.02.009
106. **Bengtsson A, Joergensen L, Rask TS, Olsen RW, Andersen MA, Turner L, et al.** A novel domain cassette identifies Plasmodium falciparum PfEMP1 proteins binding ICAM-1 and is a target of cross-reactive, adhesion-inhibitory antibodies. *J Immunol Baltim Md 1950* (2013) 190:240–249. doi: 10.4049/jimmunol.1202578
107. **Berger SS, Turner L, Wang CW, Petersen JEV, Kraft M, Lusingu JPA, et al.** Plasmodium falciparum expressing domain cassette 5 type PfEMP1 (DC5-PfEMP1) bind PECAM1. *PloS One* (2013) 8:e69117. doi: 10.1371/journal.pone.0069117
108. **Turner L, Lavstsen T, Berger SS, Wang CW, Petersen JEV, Avril M, et al.** Severe malaria is associated with parasite binding to endothelial protein C receptor. *Nature* (2013) 498:502–505. doi: 10.1038/nature12216
109. **Jensen AR, Adams Y, Hviid L.** Cerebral Plasmodium falciparum malaria: the role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. *Immunol Rev* (2020) 293:230–252. doi: 10.1111/imr.12807
110. **Avril M, Bernabeu M, Benjamin M, Brazier AJ, Smith JD.** Interaction between Endothelial Protein C Receptor and Intercellular Adhesion Molecule 1 to Mediate Binding of Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes to Endothelial Cells. *mBio* (2016) 7:e00615-16. doi: 10.1128/mBio.00615-16
111. **Kessler A, Dankwa S, Bernabeu M, Harawa V, Danziger SA, Duffy F, et al.** Linking EPCR-binding PfEMP1 to brain swelling in pediatric cerebral malaria. *Cell Host Microbe* (2017) 22:601-614.e5. doi: 10.1016/j.chom.2017.09.009
112. **Chan J-A, Howell KB, Reiling L, Ataide R, Mackintosh CL, Fowkes FJI, et al.** Targets of antibodies against Plasmodium falciparum-infected erythrocytes in malaria immunity. *J Clin Invest* (2012) 122:3227–3238. doi: 10.1172/JCI62182
113. **Wittchen ES.** Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration. *Front Biosci Landmark Ed* (2009) 14:2522–2545. doi: 10.2741/3395

114. **Yam XY, Niang M, Madnani KG, Preiser PR.** Three is a crowd – new insights into rosetting in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol* (2017) 33:309–320. doi: 10.1016/j.pt.2016.12.012
115. **Mercereau-Puijalon O, Guillotte M, Vigan-Womas I.** Rosetting in *Plasmodium falciparum*: a cytoadherence phenotype with multiple actors. *Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang* (2008) 15:62–71. doi: 10.1016/j.tracli.2008.04.003
116. **van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE.** A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol* (2006) 22:503–508. doi: 10.1016/j.pt.2006.09.002
117. **Weyrich AS, Zimmerman GA.** Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* (2004) 25:489–495. doi: 10.1016/j.it.2004.07.003
118. **Grau GE, Mackenzie CD, Carr RA, Redard M, Pizzolato G, Allasia C, et al.** Platelet accumulation in brain microvessels in fatal pediatric cerebral malaria. *J Infect Dis* (2003) 187:461–466. doi: 10.1086/367960
119. **Wassmer SC, Taylor T, Maclennan CA, Kanjala M, Mukaka M, Molyneux ME, et al.** Platelet-induced clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes from Malawian patients with cerebral malaria-possible modulation in vivo by thrombocytopenia. *J Infect Dis* (2008) 197:72–78. doi: 10.1086/523761
120. **Thomas S.** Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. *Clin Lab* (2002) 48:247–262.
121. **Chaudhary A, Kataria P, Surela N, Das J.** Pathophysiology of cerebral malaria: implications of mscs as a regenerative medicinal tool. *Bioengineering* (2022) 9:263. doi: 10.3390/bioengineering9060263
122. **Ghazanfari N, Mueller SN, Heath WR.** Cerebral malaria in mouse and man. *Front Immunol* (2018) 9:2016. doi: 10.3389/fimmu.2018.02016
123. **Ramachandran A, Sharma A.** Dissecting the mechanisms of pathogenesis in cerebral malaria. *PLOS Pathog* (2022) 18:e1010919. doi: 10.1371/journal.ppat.1010919
124. **von Hundelshausen P, Petersen F, Brandt E.** Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost* (2007) 97:704–713. doi: 10.1160/th07-01-0066
125. **Wassmer SC, de Souza JB, Frère C, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE.** TGF-beta1 released from activated platelets can induce TNF-stimulated human brain endothelium apoptosis: a new mechanism for microvascular lesion during cerebral malaria. *J Immunol Baltim Md 1950* (2006) 176:1180–1184. doi: 10.4049/jimmunol.176.2.1180
126. **Biswas AK, Hafiz A, Banerjee B, Kim KS, Datta K, Chitnis CE.** *Plasmodium falciparum* uses gC1qR/HABP1/p32 as a receptor to bind to vascular endothelium and for platelet-mediated clumping. *PLOS Pathog* (2007) 3:e130. doi: 10.1371/journal.ppat.0030130
127. **Zhang T-T, Li W, Meng G, Wang P, Liao W.** Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. *Biomater Sci* (2016) 4:219–229. doi: 10.1039/c5bm00383k

128. **Langen UH, Ayloo S, Gu C.** Development and cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2019) 35:591–613. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100617-062608
129. **Alhadidi Q, Bin Sayeed MS, Shah ZA.** The interplay between cofilin and phospho-cofilin: its role in maintaining blood brain barrier integrity. *CNS Neurol Disord Drug Targets* (2017) 16:279–290. doi: 10.2174/1871527316666170117115040
130. **Rössler K, Neuchrist C, Kitz K, Scheiner O, Kraft D, Lassmann H.** Expression of leucocyte adhesion molecules at the human blood-brain barrier (BBB). *J Neurosci Res* (1992) 31:365–374. doi: 10.1002/jnr.490310219
131. **Chu C, Li JY, Boado RJ, Pardridge WM.** Blood-brain barrier genomics and cloning of a novel organic anion transporter. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* (2008) 28:291–301. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600538
132. **Tietz S, Engelhardt B.** Brain barriers: crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J Cell Biol* (2015) 209:493–506. doi: 10.1083/jcb.201412147
133. **Liebner S, Czupalla CJ, Wolburg H.** Current concepts of blood-brain barrier development. *Int J Dev Biol* (2011) 55:467–476. doi: 10.1387/ijdb.103224sl
134. **Abbott NJ.** Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis* (2013) 36:437–449. doi: 10.1007/s10545-013-9608-0
135. **Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD.** Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* (2006) 1:223–236. doi: 10.1007/s11481-006-9025-3
136. **Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM.** Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* (2013) 19:1584–1596. doi: 10.1038/nm.3407
137. **Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y.** The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduct Target Ther* (2023) 8:1–27. doi: 10.1038/s41392-023-01481-w
138. **Nishanth G, Schlüter D.** Blood-brain barrier in cerebral malaria: pathogenesis and therapeutic intervention. *Trends Parasitol* (2019) 35:516–528. doi: 10.1016/j.pt.2019.04.010
139. **Pino P, Taoufiq Z, Nitchou J, Vouldoukis I, Mazier D.** Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: Suicide or murder? *Thromb Haemost* (2005) 94:336–340. doi: 10.1160/TH05-05-0354
140. **Hora R, Kapoor P, Thind KK, Mishra PC.** Cerebral malaria – clinical manifestations and pathogenesis. *Metab Brain Dis* (2016) 31:225–237. doi: 10.1007/s11011-015-9787-5
141. **Pal P, Daniels BP, Oskman A, Diamond MS, Klein RS, Goldberg DE.** Plasmodium falciparum Histidine-Rich Protein II compromises brain endothelial barriers and may promote cerebral malaria pathogenesis. *mBio* (2016) 7:e00617-16. doi: 10.1128/mBio.00617-16
142. **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. doi: 10.1371/journal.pone.0035985
143. **Manning L, Laman M, Stanistic D, Rosanas-Urgell A, Bona C, Teine D, et al.** Plasma Plasmodium falciparum histidine-rich protein-2 concentrations do not reflect severity of malaria in Papua new guinean children. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* (2011) 52:440–446. doi: 10.1093/cid/ciq105
 144. **Darling TK, Mimche PN, Bray C, Umaru B, Brady LM, Stone C, et al.** EphA2 contributes to disruption of the blood-brain barrier in cerebral malaria. *PLoS Pathog* (2020) 16:e1008261. doi: 10.1371/journal.ppat.1008261
 145. **Barrera V, Haley MJ, Strangward P, Attree E, Kamiza S, Seydel KB, et al.** Comparison of CD8+ T Cell accumulation in the brain during human and murine cerebral malaria. *Front Immunol* (2019) 10:1747. doi: 10.3389/fimmu.2019.01747
 146. **Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM.** Role of angiopoietin-2 in vascular physiology and pathophysiology. *Cells* (2019) 8:471. doi: 10.3390/cells8050471
 147. **Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, et al.** Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol* (2008) 10:527–537. doi: 10.1038/ncb1715
 148. **Jain V, Lucchi NW, Wilson NO, Blackstock AJ, Nagpal AC, Joel PK, et al.** Plasma levels of angiopoietin-1 and -2 predict cerebral malaria outcome in central India. *Malar J* (2011) 10:383. doi: 10.1186/1475-2875-10-383
 149. **Conroy AL, Glover SJ, Hawkes M, Erdman LK, Seydel KB, Taylor TE, et al.** Angiopoietin-2 levels are associated with retinopathy and predict mortality in Malawian children with cerebral malaria: a retrospective case-control study. *Crit Care Med* (2012) 40:952–959. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182373157
 150. **Jain V, Thomas T, Basak S, Sharma RK, Singh N.** Sequential dysregulated plasma levels of angiopoietins (ANG-2 and ratios of ANG-2/ANG-1) are associated with malaria severity and mortality among hospital admitted cases in South Bastar Region of Chhattisgarh, Central India. *Pathog Glob Health* 116:47–58. doi: 10.1080/20477724.2021.1953685
 151. **Mwanga-Amumpaire J, Carroll RW, Baudin E, Kemigisha E, Nampijja D, Mworozzi K, et al.** Inhaled nitric oxide as an adjunctive treatment for cerebral malaria in children: a phase II randomized open-label clinical trial. *Open Forum Infect Dis* (2015) 2:ofv111. doi: 10.1093/ofid/ofv111
 152. **Hawkes MT, Conroy AL, Opoka RO, Hermann L, Thorpe KE, McDonald C, et al.** Inhaled nitric oxide as adjunctive therapy for severe malaria: a randomized controlled trial. *Malar J* (2015) 14:421. doi: 10.1186/s12936-015-0946-2
 153. **Dietmann A, Lackner P, Helbok R, Spora K, Issifou S, Lell B, et al.** Opposed circulating plasma levels of endothelin-1 and C-type natriuretic peptide in children with Plasmodium falciparum malaria. *Malar J* (2008) 7:253. doi: 10.1186/1475-2875-7-253
 154. **Jain V, Armah HB, Tongren JE, Ned RM, Wilson NO, Crawford S, et al.** Plasma IP-10, apoptotic and angiogenic factors associated with fatal cerebral malaria in India. *Malar J* (2008) 7:83. doi: 10.1186/1475-2875-7-83

155. **O’Sullivan JM, Preston RJS, O’Regan N, O’Donnell JS.** Emerging roles for hemostatic dysfunction in malaria pathogenesis. *Blood* (2016) 127:2281–2288. doi: 10.1182/blood-2015-11-636464
156. **Medana IM, Turner GDH.** Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int J Parasitol* (2006) 36:555–568. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.02.004
157. **Idro R, Kakooza-Mwesige A, Asea B, Ssebyala K, Bangirana P, Opoka RO, et al.** Cerebral malaria is associated with long-term mental health disorders: a cross sectional survey of a long-term cohort. *Malar J* (2016) 15:184. doi: 10.1186/s12936-016-1233-6
158. **Chua CLL, Brown G, Hamilton JA, Rogerson S, Boeuf P.** Monocytes and macrophages in malaria: protection or pathology? *Trends Parasitol* (2013) 29:26–34. doi: 10.1016/j.pt.2012.10.002
159. **Rénia L, Wu Howland S, Claser C, Charlotte Gruner A, Suwanarusk R, Hui Teo T, et al.** *Cerebral malaria. Virulence* (2012) 3:193–201. doi: 10.4161/viru.19013
160. **Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV.** Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction “opening”: signaling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci* (2003) 116:4615–4628. doi: 10.1242/jcs.00755
161. **Bernabeu M, Smith JD.** EPCR and malaria severity: the center of a perfect storm. *Trends Parasitol* (2017) 33:295–308. doi: 10.1016/j.pt.2016.11.004
162. **Rénia L, Howland SW, Claser C, Charlotte Gruner A, Suwanarusk R, Hui Teo T, et al.** Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence* (2012) 3:193–201. doi: 10.4161/viru.19013
163. **Schiess N, Villabona-Rueda A, Cottier KE, Huether K, Chipeta J, Stins MF.** Pathophysiology and neurologic sequelae of cerebral malaria. *Malar J* (2020) 19:266. doi: 10.1186/s12936-020-03336-z
164. **Ozarlan N, Robinson JF, Gaw SL.** Circulating monocytes, tissue macrophages, and malaria. *J Trop Med* (2019) 2019:e3720838. doi: 10.1155/2019/3720838
165. **Jaworowski A, Kamwendo DD, Ellery P, Sonza S, Mwapasa V, Tadesse E, et al.** CD16+ monocyte subset preferentially harbors hiv-1 and is expanded in pregnant malawian women with Plasmodium falciparum malaria and HIV-1 Infection. *J Infect Dis* (2007) 196:38–42. doi: 10.1086/518443
166. **Gama L, Shirk EN, Russell JN, Carvalho KI, Li M, Queen SE, et al.** Expansion of a subset of CD14highCD16negCCR2low/neg monocytes functionally similar to myeloid-derived suppressor cells during SIV and HIV infection. *J Leukoc Biol* (2012) 91:803–816. doi: 10.1189/jlb.1111579
167. **Serbina NV, Pamer EG.** Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* (2006) 7:311–317. doi: 10.1038/ni1309
168. **Sprangers S, de Vries TJ, Everts V.** Monocyte heterogeneity: consequences for monocyte-derived immune cells. *J Immunol Res* (2016) 2016:1475435. doi: 10.1155/2016/1475435

169. **Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, et al.** Human classical monocytes control the intracellular stage of leishmania braziliensis by reactive oxygen species. *J Infect Dis* (2014) 209:1288–1296. doi: 10.1093/infdis/jiu013
170. **Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, et al.** Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* (2010) 33:375–386. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.012
171. **Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al.** Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Front Immunol* (2019) 10:2035. doi: 10.3389/fimmu.2019.02035
172. **Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M.** Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol* (2001) 31:48–56. doi: 10.1002/1521-4141(200101)31:1<48::aid-immu48>3.0.co;2-5
173. **Schmidl C, Renner K, Peter K, Eder R, Lassmann T, Balwierz PJ, et al.** Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets. *Blood* (2014) 123:e90–99. doi: 10.1182/blood-2013-02-484188
174. **Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Loseke S, Grage-Griebenow E, Zembala M, Pryjma J.** Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* (2008) 67:152–159. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02051.x
175. **Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska AM, Moniuszko M.** The role of different monocyte subsets in the pathogenesis of atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Scand J Immunol* (2015) 82:163–173. doi: 10.1111/sji.12314
176. **Xuan KM, Bakar NA, Fadzli Mustaffa KM, Azlan M.** The role of monocytes in malaria infection. *Cent-Eur J Immunol* (2013) 48:54–62. doi: 10.5114/ceji.2023.126650
177. **Royo J, Camara A, Bertrand B, Batigne P, Coste A, Pipy B, Aubouy A, NeuroCM Group.** Kinetics of monocyte subpopulations during experimental cerebral malaria and its resolution in a model of late chloroquine treatment. *Front Cell Infect Microbiol* (2022) 12:952993. doi: 10.3389/fcimb.2022.952993
178. **Cunningham DA, Lin J, Brugat T, Jarra W, Tumwine I, Kushinga G, et al.** ICAM-1 is a key receptor mediating cytoadherence and pathology in the Plasmodium chabaudi malaria model. *Malar J* (2017) 16:185. doi: 10.1186/s12936-017-1834-8
179. **He Z, Yu C, Pan Z, Li X, Zhang X, Huang Q, et al.** Erythrocyte membrane with CLIPPKF as biomimetic nanodecoy traps merozoites and attaches to infected red blood cells to prevent Plasmodium infection. *J Nanobiotechnology* (2023) 21:15. doi: 10.1186/s12951-022-01709-x
180. **Grau GER, Craig AG.** Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future Microbiol* (2012) 7:291–302. doi: 10.2217/fmb.11.155
181. **Srivastava K, Field DJ, Aggrey A, Yamakuchi M, Morrell CN.** Platelet factor 4 regulation of monocyte KLF4 in experimental cerebral malaria. *PLoS One* (2010) 5:e10413. doi: 10.1371/journal.pone.0010413

182. **Patel SN, Berghout J, Lovegrove FE, Ayi K, Conroy A, Serghides L, et al.** C5 deficiency and C5a or C5aR blockade protects against cerebral malaria. *J Exp Med* (2008) 205:1133–1143. doi: 10.1084/jem.20072248
183. **Royo J, Rahabi M, Kamaliddin C, Ezinmegnon S, Olagnier D, Authier H, et al.** Changes in monocyte subsets are associated with clinical outcomes in severe malarial anaemia and cerebral malaria. *Sci Rep* (2019) 9:17545. doi: 10.1038/s41598-019-52579-7
184. **Dobbs KR, Embury P, Vulule J, Odada PS, Rosa BA, Mitreva M, et al.** Monocyte dysregulation and systemic inflammation during pediatric falciparum malaria. *JCI Insight* (2017) 2:e95352, 95352. doi: 10.1172/jci.insight.95352
185. **Ogonda LA, Orago ASS, Otieno MF, Adhiambo C, Otieno W, Stoute JA.** The levels of CD16/Fc gamma receptor IIIA on CD14+ CD16+ monocytes are higher in children with severe Plasmodium falciparum anemia than in children with cerebral or uncomplicated malaria. *Infect Immun* (2010) 78:2173–2181. doi: 10.1128/IAI.01078-09
186. **Schumak B, Klocke K, Kuepper JM, Biswas A, Djie-Maletz A, Limmer A, et al.** Specific Depletion of Ly6Chi Inflammatory Monocytes Prevents Immunopathology in Experimental Cerebral Malaria. *PLoS ONE* (2015) 10:e0124080. doi: 10.1371/journal.pone.0124080
187. **Bansal GP, Weinstein CS, Kumar N.** Insight into phagocytosis of mature sexual (gametocyte) stages of Plasmodium falciparum using a human monocyte cell line. *Acta Trop* (2016) 157:96–101. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.01.033
188. **Beri D, Balan B, Tatu U.** Commit, hide and escape: the story of Plasmodium gametocytes. *Parasitology* (2018) 145:1772–1782. doi: 10.1017/S0031182018000926
189. **Smith TG, Serghides L, Patel SN, Febbraio M, Silverstein RL, Kain KC.** CD36-mediated nonopsonic phagocytosis of erythrocytes infected with stage I and IIA gametocytes of Plasmodium falciparum. *Infect Immun* (2003) 71:393–400. doi: 10.1128/IAI.71.1.393-400.2003
190. **Corbett Y, Parapini S, Perego F, Messina V, Delbue S, Misiano P, et al.** Phagocytosis and activation of bone marrow-derived macrophages by Plasmodium falciparum gametocytes. *Malar J* (2021) 20:81. doi: 10.1186/s12936-021-03589-2
191. **Tham W-H, Wilson DW, Lopaticki S, Schmidt CQ, Tetteh-Quarcoo PB, Barlow PN, et al.** Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:17327–17332. doi: 10.1073/pnas.1008151107
192. **Chandley P, Ranjan R, Kumar S, Rohatgi S.** Host-parasite interactions during Plasmodium infection: Implications for immunotherapies. *Front Immunol* (2022) 13:1091961. doi: 10.3389/fimmu.2022.1091961
193. **Erdman LK, Cosio G, Helmers AJ, Gowda DC, Grinstein S, Kain KC.** CD36 and TLR interactions in inflammation and phagocytosis: implications for malaria. *J Immunol Baltim Md 1950* (2009) 183:6452–6459. doi: 10.4049/jimmunol.0901374
194. **Barfod L, Dalgaard MB, Pleman ST, Ofori MF, Pleass RJ, Hviid L.** 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) 108:12485–12490. doi: 10.1073/pnas.1103708108
195. **Chaudhury S, Regules JA, Darko CA, Dutta S, Wallqvist A, Waters NC, et al.** Delayed fractional dose regimen of the RTS,S/AS01 malaria vaccine candidate enhances an IgG4 response that inhibits serum opsonophagocytosis. *Sci Rep* (2017) 7:7998. doi: 10.1038/s41598-017-08526-5
 196. **Guilliams M, Mildner A, Yona S.** Developmental and functional heterogeneity of monocytes. *Immunity* (2018) 49:595–613. doi: 10.1016/j.immuni.2018.10.005
 197. **Chua CLL, Ng IMJ, Yap BJM, Teo A.** Factors influencing phagocytosis of malaria parasites: the story so far. *Malar J* (2021) 20:319. doi: 10.1186/s12936-021-03849-1
 198. **Antonelli LRV, Leoratti FMS, Costa PAC, Rocha BC, Diniz SQ, Tada MS, et al.** The CD14+CD16+ Inflammatory Monocyte Subset Displays Increased Mitochondrial Activity and Effector Function During Acute Plasmodium vivax Malaria. *PLoS Pathog* (2014) 10:e1004393. doi: 10.1371/journal.ppat.1004393
 199. **Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, Filgueira M-C, Tartar A, Druilhe P.** Merozoite Surface Protein-3: A Malaria Protein Inducing Antibodies That Promote Plasmodium falciparum Killing by Cooperation With Blood Monocytes. *Blood* (1994) 84:1594–1602. doi: 10.1182/blood.V84.5.1594.1594
 200. **Beeson JG, Drew DR, Boyle MJ, Feng G, Fowkes FJI, Richards JS.** Merozoite surface proteins in red blood cell invasion, immunity and vaccines against malaria. *FEMS Microbiol Rev* (2016) 40:343–372. doi: 10.1093/femsre/fuw001
 201. **Treffers LW, van Houdt M, Bruggeman CW, Heineke MH, Zhao XW, van der et al.** FcγRIIIb Restricts Antibody-Dependent Destruction of Cancer Cells by Human Neutrophils. *Front Immunol* (2019) 9:3124. doi: 10.3389/fimmu.2018.03124
 202. **Bachmann A, Metwally NG, Allweier J, Cronshagen J, Del Pilar Martinez Tauler M, et al.** CD36-A Host Receptor Necessary for Malaria Parasites to Establish and Maintain Infection. *Microorganisms* (2022) 10:2356. doi: 10.3390/microorganisms10122356
 203. **Stanisic DI, Cutts J, Eriksson E, Fowkes FJI, Rosanas-Urgell A, Siba P, et al.** γδ T cells and CD14+ monocytes are predominant cellular sources of cytokines and chemokines associated with severe malaria. *J Infect Dis* (2014) 210:295–305. doi: 10.1093/infdis/jiu083
 204. **Palomo J, Quesniaux VFJ, Togbe D, Reverchon F, Ryffel B.** Unravelling the roles of innate lymphoid cells in cerebral malaria pathogenesis. *Parasite Immunol* (2018) 40: doi: 10.1111/pim.12502
 205. **Pohl K, Cockburn IA.** Innate immunity to malaria: The good, the bad and the unknown. *Front Immunol* (2022) 13:914598. doi: 10.3389/fimmu.2022.914598
 206. **Ammar AI, El-Hefnawy SM, Shehab-Eldeen S, Essa A, ELnaidany SS, Mostafa RG, et al.** Plasmodium falciparum malaria susceptibility and severity: Influence of MyD88-Adaptor-Like Gene (rs8177374) Polymorphism. *Infect Drug Resist* (2022) 15:6815–6827. doi: 10.2147/IDR.S387463

207. **Giribaldi G, Prato M, Ulliers D, Gallo V, Schwarzer E, Akide-Ndunge OB, et al.** Involvement of inflammatory chemokines in survival of human monocytes fed with malarial pigment. *Infect Immun* (2010) 78:4912–4921. doi: 10.1128/IAI.00455-10
208. **Potter SM, Mitchell AJ, Cowden WB, Sanni LA, Dinauer M, de Haan JB, et al.** Phagocyte-derived reactive oxygen species do not influence the progression of murine blood-stage malaria infections. *Infect Immun* (2005) 73:4941–4947. doi: 10.1128/IAI.73.8.4941-4947.2005
209. **Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PSOC, et al.** Oxidative stress in malaria. *Int J Mol Sci* (2012) 13:16346–16372. doi: 10.3390/ijms131216346
210. **Burda P-C, Crosskey T, Lauk K, Zurborg A, Söhnchen C, Liffner B, et al.** Structure-based identification and functional characterization of a lipocalin in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell Rep* (2020) 31:107817. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107817
211. **Nguee SYT, Júnior JWBD, Epiphanio S, Rénia L, Claser C.** Experimental models to study the pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Front Cell Infect Microbiol* (2022) 12:899581. doi: 10.3389/fcimb.2022.899581
212. **Na-Ek P, Punsawad C.** Expression of 4-Hydroxynonenal (4-HNE) and Heme Oxygenase-1 (HO-1) in the Kidneys of *Plasmodium berghei*-Infected Mice. *J Trop Med* (2020) 2020:8813654. doi: 10.1155/2020/8813654
213. **Götz A, Ty MC, Rodriguez A.** Oxidative stress enhances dendritic cell responses to *plasmodium falciparum*. *ImmunoHorizons* (2019) 3:511–518. doi: 10.4049/immunohorizons.1900076
214. **Eisenbarth SC.** Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol* (2019) 19:89–103. doi: 10.1038/s41577-018-0088-1
215. **Ty MC, Zuniga M, Götz A, Kayal S, Sahu PK, Mohanty A, Mohanty S, Wassmer SC, Rodriguez A.** Malaria inflammation by xanthine oxidase-produced reactive oxygen species. *EMBO Mol Med* (2019) 11:e9903. doi: 10.15252/emmm.201809903
216. **Borges TKS, Alves ÉAR, Vasconcelos HAR, Carneiro FP, Nicola AM, Magalhães KG, et al.** Differences in the modulation of reactive species, lipid bodies, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and PPAR- γ in cerebral malaria-susceptible and resistant mice. *Immunobiology* (2017) 222:604–619. doi: 10.1016/j.imbio.2016.11.010
217. **Gunjan S, Singh SK, Sharma T, Dwivedi H, Chauhan BS, Imran Siddiqi M, et al.** Mefloquine induces ROS mediated programmed cell death in malaria parasite: *Plasmodium*. Apoptosis *Int J Program Cell Death* (2016) 21:955–964. doi: 10.1007/s10495-016-1265-y
218. **Giovanella F, Ferreira GK, de Prá SDT, Carvalho-Silva M, Gomes LM, Scaini G, et al.** Effects of primaquine and chloroquine on oxidative stress parameters in rats. *An Acad Bras Cienc* (2015) 87:1487–1496. doi: 10.1590/0001-3765201520140637
219. **Zhu P, Zhou B.** The antagonizing role of heme in the antimalarial function of artemisinin: elevating intracellular free heme negatively impacts artemisinin activity in

- Plasmodium falciparum. *Mol Basel Switz* (2022) 27:1755. doi: 10.3390/molecules27061755
220. **Gomes ARQ, Cunha N, Varela ELP, Brígido HPC, Vale VV, Dolabela MF, et al.** Oxidative stress in malaria: potential benefits of antioxidant therapy. *Int J Mol Sci* (2022) 23:5949. doi: 10.3390/ijms23115949
 221. **Sahu PK, Hoffmann A, Majhi M, Pattnaik R, Patterson C, Mahanta KC, et al.** Brain magnetic resonance imaging reveals different courses of disease in pediatric and adult cerebral malaria. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* (2021) 73:e2387–e2396. doi: 10.1093/cid/ciaa1647
 222. **Steidl U, Haas R, Kronenwett R.** Intercellular adhesion molecular 1 on monocytes mediates adhesion as well as trans-endothelial migration and can be downregulated using antisense oligonucleotides. *Ann Hematol* (2000) 79:414–423. doi: 10.1007/s002770000168
 223. **Cserti-Gazdewich CM, Dzik WH, Erdman L, Ssewanyana I, Dhabangi A, Musoke C, Kain KC.** Combined measurement of soluble and cellular ICAM-1 among children with Plasmodium falciparum malaria in Uganda. *Malar J* (2010) 9:233. doi: 10.1186/1475-2875-9-233
 224. **Ramos TN, Bullard DC, Darley MM, McDonald K, Crawford DF, Barnum SR.** Experimental cerebral malaria develops independently of endothelial expression of intercellular adhesion molecule-1 (icam-1). *J Biol Chem* (2013) 288:10962–10966. doi: 10.1074/jbc.C113.457028
 225. **Blankson SO, Dikroh L, Tettey P, Tornyigah B, Adamou R, Moussiliou A, et al.** Association of Endothelial Protein C Receptor (EPCR) rs867186 gene polymorphism with increased levels of soluble epcr and high risk of severe malaria and fatality in Beninese children. *J Infect Dis* (2023) 227:179–182. doi: 10.1093/infdis/jiac461
 226. **Akide Ndunge OB, Kilian N, Salman MM.** Cerebral malaria and neuronal implications of plasmodium falciparum infection: from mechanisms to advanced models. *Adv Sci Weinh Baden-Wurttemberg Ger* (2022) 9:e2202944. doi: 10.1002/advs.202202944
 227. **Eisenhut M.** Low angiopoietin-1 as a predisposing factor for cerebral vasospasm in cerebral malaria. *Crit Care Med* (2012) 40:3333–3334; author reply 3334. doi: 10.1097/CCM.0b013e318267a8d4
 228. **Oluboyo AO, Chukwu SI, Oluboyo BO, Odewusi OO.** Evaluation of Angiopoietins 1 and 2 in malaria-infested children. *J Environ Public Health* (2020) 2020:2169763. doi: 10.1155/2020/2169763
 229. **Wilson NO, Jain V, Roberts CE, Lucchi N, Joel PK, Singh MP, et al.** CXCL4 and CXCL10 predict risk of fatal cerebral malaria. *Dis Markers* (2011) 30:39–49. doi: 10.3233/DMA-2011-0763
 230. **Mbambo G, Dwivedi A, Ifeonu OO, Munro JB, Shrestha B, Bromley RE, et al.** Immunogenomic profile at baseline predicts host susceptibility to clinical malaria. *Front Immunol* (2023) 14:1179314. doi: 10.3389/fimmu.2023.1179314
 231. **Thakur K, Vareta J, Carson K, Taylor T, Sullivan D, Seydel K.** Performance of Cerebrospinal Fluid (CSF) Plasmodium Falciparum Histidine-Rich Protein-2

- (pfHRP-2) in Prediction of Death in Cerebral Malaria (S10.007). *Neurology* (2014) 82:S10.007. doi: 10.1212/WNL.82.10_supplement.S10.007
232. **Zheng Z, Liu H, Wang X, Zhang Y, Qu S, Yang Y, et al.** Artesunate and tetramethylpyrazine exert effects on experimental cerebral malaria in a mechanism of protein S-Nitrosylation. *ACS Infect Dis* (2021) 7:2836–2849. doi: 10.1021/acsinfecdis.1c00085
233. **Wu X, Thylur RP, Dayanand KK, Punnath K, Norbury CC, Gowda DC.** IL-4 treatment mitigates experimental cerebral malaria by reducing parasitemia, dampening inflammation, and lessening the cytotoxicity of T cells. *J Immunol Baltim Md 1950* (2021) 206:118–131. doi: 10.4049/jimmunol.2000779
234. **Duan H, Zhao S, Xiang J, Ju C, Chen X, Gramaglia I, et al.** Targeting the CD146/Galectin-9 axis protects the integrity of the blood-brain barrier in experimental cerebral malaria. *Cell Mol Immunol* (2021) 18:2443–2454. doi: 10.1038/s41423-020-00582-8
235. **Jiang X, Chen L, Zheng Z, Chen Y, Weng X, Guo Y, et al.** Synergistic effect of combined artesunate and tetramethylpyrazine in experimental cerebral malaria. *ACS Infect Dis* (2020) 6:2400–2409. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00124
236. **Jiang X-H, Chen L-N, Li K, Guo Y, Zheng Z-Y, Yang T, et al.** Protective effects of artesunate combination on experimental cerebral malaria and nerve injury. *Chin Mater Medica* (2018) 43:3051–3057. doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20180608.002
237. **Dormoi J, Briolant S, Pascual A, Desgrouas C, Travaille C, Pradines B.** Improvement of the efficacy of dihydroartemisinin with atorvastatin in an experimental cerebral malaria murine model. *Malar J* (2013) 12:302. doi: 10.1186/1475-2875-12-302
238. **Song X, Cheng W, Zhu H, Li Y, Li J.** Additive therapy of Plasmodium berghei-induced experimental cerebral malaria via dihydroartemisinin combined with rapamycin and atorvastatin. *Microbiol Spectr* (2023) 11:e0231722. doi: 10.1128/spectrum.02317-22
239. **Varo R, Crowley VM, Siteo A, Madrid L, Serghides L, Kain KC, et al.** Adjunctive therapy for severe malaria: a review and critical appraisal. *Malar J* (2018) 17:47. doi: 10.1186/s12936-018-2195-7
240. **Mejia P, Treviño-Villarreal JH, Reynolds JS, De Niz M, Thompson A, Marti M, et al.** A single rapamycin dose protects against late-stage experimental cerebral malaria via modulation of host immunity, endothelial activation and parasite sequestration. *Malar J* (2017) 16:455. doi: 10.1186/s12936-017-2092-5
241. **Maude RJ, Silamut K, Plewes K, Charunwatthana P, Ho M, Abul Faiz M, et al.** Randomized controlled trial of levamisole hydrochloride as adjunctive therapy in severe falciparum malaria with high parasitemia. *J Infect Dis* (2014) 209:120–129. doi: 10.1093/infdis/jit410
242. **Dondorp AM, Silamut K, Charunwatthana P, Chuasuwanchai S, Ruangveerayut R, et al.** Levamisole inhibits sequestration of infected red blood cells in patients with falciparum malaria. *J Infect Dis* (2007) 196:460–466.
243. **Warrell DA, Looareesuwan S, Warrell MJ, Kasemsarn P, Intaraprasert R, Bunnag D, et al.** Dexamethasone proves deleterious in cerebral malaria. a double-blind

- trial in 100 comatose patients. *N Engl J Med* (1982) 306:313–319. doi: 10.1056/NEJM198202113060601
244. **Lell B, Köhler C, Wamola B, Olola CH, Kivaya E, Kokwaro G, et al.** Pentoxifylline as an adjunct therapy in children with cerebral malaria. *Malar J* (2010) 9:368. doi: 10.1186/1475-2875-9-368
245. **Das BK, Mishra S, Padhi PK, Manish R, Tripathy R, Sahoo PK, et al.** Pentoxifylline adjunct improves prognosis of human cerebral malaria in adults. *Trop Med Int Health TM IH* (2003) 8:680–684. doi: 10.1046/j.1365-3156.2003.01087.x
246. **Higgins SJ, Kain KC, Liles WC.** Immunopathogenesis of falciparum malaria: implications for adjunctive therapy in the management of severe and cerebral malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther* (2011) 9:803–819. doi: 10.1586/eri.11.96
247. **John CC, Kutamba E, Mugarura K, Opoka RO.** Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of Plasmodium falciparum malaria. *Expert Rev Anti Infect Ther* (2010) 8:997–1008. doi: 10.1586/eri.10.90
248. **Mejia P, Treviño-Villarreal JH, Hine C, Harputlugil E, Lang S, Calay E, et al.** Dietary restriction protects against experimental cerebral malaria via leptin modulation and T-cell mTORC1 suppression. *Nat Commun* (2015) 6:6050. doi: 10.1038/ncomms7050
249. **Crunkhorn S.** Infectious disease: Glutamine analogue reverses cerebral malaria. *Nat Rev Drug Discov* (2015) 14:820. doi: 10.1038/nrd4786
250. **Gordon EB, Hart GT, Tran TM, Waisberg M, Akkaya M, Kim AS, et al.** Targeting glutamine metabolism rescues mice from late-stage cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) 112:13075–13080. doi: 10.1073/pnas.1516544112
251. **Mohanty D, Ghosh K, Pathare AV, Karnad D.** Deferiprone (L1) as an adjuvant therapy for Plasmodium falciparum malaria. *Indian J Med Res* (2002) 115:17–21.
252. **Gordeuk V, Thuma P, Brittenham G, McLaren C, Parry D, Backenstose A, et al.** Effect of iron chelation therapy on recovery from deep coma in children with cerebral malaria. *N Engl J Med* (1992) 327:1473–1477. doi: 10.1056/NEJM199211193272101
253. **Thuma PE, Mabeza GF, Biemba G, Bhat GJ, McLaren CE, Moyo VM, et al.** Effect of iron chelation therapy on mortality in Zambian children with cerebral malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (1998) 92:214–218. doi: 10.1016/s0035-9203(98)90753-2
254. **Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Vilela MC, Rachid MA, Soriani FM, Sousa LP, et al.** Platelet-activating factor receptor is essential for the development of experimental cerebral malaria. *Am J Pathol* (2012) 180:246–255. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.038
255. **Souraud J-B, Briolant S, Dormoi J, Mosnier J, Savini H, Baret E, et al.** Atorvastatin treatment is effective when used in combination with mefloquine in an experimental cerebral malaria murine model. *Malar J* (2012) 11:13. doi: 10.1186/1475-2875-11-13

256. **Reis PA, Estato V, da Silva TI, d'Avila JC, Siqueira LD, Assis EF, et al.** Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathog* (2012) 8:e1003099. doi: 10.1371/journal.ppat.1003099
257. **Mohan Rao LV, Esmon CT, Pendurthi UR.** Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood* (2014) 124:1553–1562. doi: 10.1182/blood-2014-05-578328
258. **Lackner P, Helbok R, Schmutzhard E.** On recombinant human erythropoietin preventing the death of mice during cerebral malaria. *J Infect Dis* (2007) 195:1391. doi: 10.1086/513283
259. **Olagnier D, Lavergne R-A, Meunier E, Lefèvre L, Dardenne C, Aubouy A, et al.** Nrf2, a PPAR γ alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. *PLoS Pathog* (2011) 7:e1002254. doi: 10.1371/journal.ppat.1002254
260. **Boggild AK, Krudsood S, Patel SN, Serghides L, Tangpukdee N, Katz K, et al.** Use of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as adjunctive treatment for Plasmodium falciparum malaria: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* (2009) 49:841–849. doi: 10.1086/605431
261. **Serghides L, Patel SN, Ayi K, Lu Z, Gowda DC, Liles WC, et al.** Rosiglitazone modulates the innate immune response to Plasmodium falciparum infection and improves outcome in experimental cerebral malaria. *J Infect Dis* (2009) 199:1536–1545. doi: 10.1086/598222
262. **Serghides L, McDonald CR, Lu Z, Friedel M, Cui C, Ho KT, et al.** PPAR γ agonists improve survival and neurocognitive outcomes in experimental cerebral malaria and induce neuroprotective pathways in human malaria. *PLoS Pathog* (2014) 10:e1003980. doi: 10.1371/journal.ppat.1003980
263. **Fumagalli S, Perego C, Pischietta F, Zanier ER, De Simoni M-G.** The ischemic environment drives microglia and macrophage function. *Front Neurol* (2015) 6:81. doi: 10.3389/fneur.2015.00081
264. **Mortazavi SE, Lugaajju A, Nylander M, Danielsson L, Tijani MK, Beeson JG, et al.** Acquisition of complement fixing antibodies targeting Plasmodium falciparum merozoites in infants and their mothers in Uganda. *Front Immunol* (2023) 14:1295543. doi: 10.3389/fimmu.2023.1295543
265. **MacPherson GG, Warrell MJ, White NJ, Looareesuwan S, Warrell DA.** Human cerebral malaria. A quantitative ultrastructural analysis of parasitized erythrocyte sequestration. *Am J Pathol* (1985) 119:385–401.
266. **White NJ, Warrell DA, Looareesuwan S, Chanthavanich P, Phillips RE, Pongpaew P.** Pathophysiological and prognostic significance of cerebrospinal-fluid lactate in cerebral malaria. *Lancet Lond Engl* (1985) 1:776–778. doi: 10.1016/s0140-6736(85)91445-x
267. **Hunt NH, Ball HJ, Hansen AM, Khaw LT, Guo J, Bakmiwewa S, et al.** Cerebral malaria: gamma-interferon redux. *Front Cell Infect Microbiol* (2014) 4:113. doi: 10.3389/fcimb.2014.00113

268. **Feintuch CM, Saidi A, Seydel K, Chen G, Goldman-Yassen A, Mita-Mendoza NK, et al.** Activated Neutrophils Are Associated with Pediatric Cerebral Malaria Vasculopathy in Malawian Children. *mBio* (2016) 7:e01300-01315. doi: 10.1128/mBio.01300-15
269. **Osier FH, Feng G, Boyle MJ, Langer C, Zhou J, Richards JS, et al.** Opsonic phagocytosis of Plasmodium falciparum merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. *BMC Med* (2014) 12:108. doi: 10.1186/1741-7015-12-108
270. **Wolf A-S, Sherratt S, Riley EM.** NK Cells: Uncertain allies against malaria. *Front Immunol* (2017) 8:212. doi: 10.3389/fimmu.2017.00212
271. **Pais TF, Penha-Gonçalves C.** Brain Endothelium: The “Innate Immunity Response Hypothesis” in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front Immunol* (2019) 9:3100. doi: 10.3389/fimmu.2018.03100
272. **Joste V, Maurice L, Bertin GI, Aubouy A, Boumédiène F, Houzé S, et al.** Identification of Plasmodium falciparum and host factors associated with cerebral malaria: description of the protocol for a prospective, case-control study in Benin (NeuroCM). *BMJ Open* (2019) 9:e027378. doi: 10.1136/bmjopen-2018-027378
273. **Nallandhighal S, Park GS, Ho Y-Y, Opoka RO, John CC, Tran TM.** Whole-blood transcriptional signatures composed of erythropoietic and nrf2-regulated genes differ between cerebral malaria and severe malarial anemia. *J Infect Dis* (2019) 219:154–164. doi: 10.1093/infdis/jiy468
274. **Aubouy A, Olganier D, Bertin G, Ezinmegnon S, Majorel C, Mimar S, et al.** Nrf2-driven CD36 and HO-1 gene expression in circulating monocytes correlates with favourable clinical outcome in pregnancy-associated malaria. *Malar J* (2015) 14:358. doi: 10.1186/s12936-015-0888-8
275. **Wang L, Zhang X, Xiong X, Zhu H, Chen R, Zhang S, Chen G, Jian Z.** Nrf2 Regulates oxidative stress and its role in cerebral ischemic stroke. *Antioxidants* (2022) 11:2377. doi: 10.3390/antiox11122377
276. **Baska P, Norbury LJ.** The Role of nuclear factor Kappa B (NF-κB) in the immune response against parasites. *Pathogens* (2022) 11:310. doi: 10.3390/pathogens11030310
277. **Tripathi AK, Sullivan DJ, Stins MF.** Plasmodium falciparum-infected erythrocytes increase intercellular adhesion molecule 1 expression on brain endothelium through NF-kappaB. *Infect Immun* (2006) 74:3262–3270. doi: 10.1128/IAI.01625-05
278. **Tripathi AK, Sha W, Shulaev V, Stins MF, Sullivan DJ.** Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce NF-kappaB regulated inflammatory pathways in human cerebral endothelium. *Blood* (2009) 114:4243–4252. doi: 10.1182/blood-2009-06-226415
279. **Punsawad C, Maneerat Y, Chaisri U, Nantavisai K, Viriyavejakul P.** Nuclear factor kappa B modulates apoptosis in the brain endothelial cells and intravascular leukocytes of fatal cerebral malaria. *Malar J* (2013) 12:260. doi: 10.1186/1475-2875-12-260

280. **Rockett KA, Awburn MM, Cowden WB, Clark IA.** Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun* (1991) 59:3280–3283. doi: 10.1128/iai.59.9.3280-3283.1991
281. **Serirom S, Raharjo WH, Chotivanich K, Loareesuwan S, Kubes P, Ho M.** Anti-adhesive effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under flow. *Am J Pathol* (2003) 162:1651–1660. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64299-X
282. **Thiel VE, Audus KL.** Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid Redox Signal* (2001) 3:273–278. doi: 10.1089/152308601300185223
283. **Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, Dugas B, Mazier D.** Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *Plasmodium falciparum* -infected erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci* (2003) 1010:582–586. doi: 10.1196/annals.1299.109
284. **Raacke M, Kerr A, Dörpinghaus M, Brehmer J, Wu Y, Lorenzen S, et al.** Altered cytokine response of human brain endothelial cells after stimulation with malaria patient plasma. *Cells* (2021) 10:1656. doi: 10.3390/cells10071656
285. **Wilson N, Huang M, Anderson W, Bond V, Powell M, Thompson W, et al.** Soluble factors from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes induce apoptosis in human brain vascular endothelial and neuroglia cells. *Mol Biochem Parasitol* (2008) 162:172–176. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.09.003
286. **Vásquez AM, Blair S, García LF, Segura C.** *Plasmodium falciparum* isolates from patients with uncomplicated malaria promote endothelial inflammation. *Microbes Infect* (2017) 19:132–141. doi: 10.1016/j.micinf.2016.09.006
287. **Gallego-Delgado J, Rodriguez A.** Rupture and Release: A role for soluble erythrocyte content in the pathology of cerebral malaria. *Trends Parasitol* (2017) 33:832–835. doi: 10.1016/j.pt.2017.06.005
288. **Pham T-T, Lamb TJ, Deroost K, Opdenakker G, Van den Steen PE.** Hemozoin in malarial complications: more questions than answers. *Trends Parasitol* (2021) 37:226–239. doi: 10.1016/j.pt.2020.09.016
289. **Urrea X, Villamor N, Amaro S, Gómez-Choco M, Obach V, Oleaga L, et al.** Monocyte Subtypes Predict Clinical Course and Prognosis in Human Stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* (2009) 29:994–1002. doi: 10.1038/jcbfm.2009.25
290. **Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elaine G, Join-Lambert O, Kayal S, et al.** Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior. *Science* (2007) 317:666–670. doi: 10.1126/science.1142883
291. **Tyberghein A, Deroost K, Schwarzer E, Arese P, Van den Steen PE.** Immunopathological effects of malaria pigment or hemozoin and other crystals. *BioFactors Oxf Engl* (2014) 40:59–78. doi: 10.1002/biof.1119
292. **Schwarzer E, Turrini F, Ulliers D, Giribaldi G, Ginsburg H, Arese P.** Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* (1992) 176:1033–1041. doi: 10.1084/jem.176.4.1033
293. **Mujuzi G, Magambo B, Okech B, Egwang TG.** Pigmented monocytes are negative correlates of protection against severe and complicated malaria in Ugandan children. *Am J Trop Med Hyg* (2006) 74:724–729.

294. **Lyke KE, Diallo DA, Dicko A, Kone A, Coulibaly D, Guindo A, et al.** Association of intraleukocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* (2003) 69:253–259.
295. **Rogerson SJ, Pollina E, Getachew A, Tadesse E, Lema VM, Molyneux ME.** Placental monocyte infiltrates in response to *Plasmodium falciparum* malaria infection and their association with adverse pregnancy outcomes. *Am J Trop Med Hyg* (2003) 68:115–119.
296. **Torrez Dulgeroff LB, Oakley MS, Tal MC, Yiu YY, He JQ, Shoham M, et al.** CD47 blockade reduces the pathologic features of experimental cerebral malaria and promotes survival of hosts with *Plasmodium* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2021) 118:e1907653118. doi: 10.1073/pnas.1907653118
297. **Zhou J, Feng G, Beeson J, Hogarth PM, Rogerson SJ, Yan Y, et al.** CD14(hi)CD16⁺ monocytes phagocytose antibody-opsonised *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes more efficiently than other monocyte subsets, and require CD16 and complement to do so. *BMC Med* (2015) 13:154. doi: 10.1186/s12916-015-0391-7
298. **Garcia-Senosiain A, Kana IH, Singh S, Das MK, Dziegiel MH, Hertegonne S, et al.** Neutrophils dominate in opsonic phagocytosis of *P. falciparum* blood-stage merozoites and protect against febrile malaria. *Commun Biol* (2021) 4:984. doi: 10.1038/s42003-021-02511-5
299. **Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B.** Non-classical monocytes display inflammatory features: validation in sepsis and systemic lupus erythematosus. *Sci Rep* (2015) 5:13886. doi: 10.1038/srep13886
300. **Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Drayson MT, Molyneux ME, MacLennan CA.** Monocyte activation and cytokine production in Malawian children presenting with *P. falciparum* malaria. *Parasite Immunol* (2016) 38:317–325. doi: 10.1111/pim.12319
301. **Kumar S, Gowda NM, Wu X, Gowda RN, Gowda DC.** CD36 modulates proinflammatory cytokine responses to *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositols and merozoites by dendritic cells. *Parasite Immunol* (2012) 34:372–382. doi: 10.1111/j.1365-3024.2012.01367.x
302. **Hochman SE, Madaline TF, Wassmer SC, Mbale E, Choi N, Seydel KB, et al.** Fatal pediatric cerebral malaria is associated with intravascular monocytes and platelets that are increased with HIV coinfection. *mBio* (2015) 6:e01390-01315. doi: 10.1128/mBio.01390-15
303. **Popa GL, Popa MI.** Recent advances in understanding the inflammatory response in malaria: a review of the dual role of cytokines. *J Immunol Res* (2021) 2021:7785180. doi: 10.1155/2021/7785180
304. **Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, et al.** TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet Lond Engl* (1990) 336:1201–1204. doi: 10.1016/0140-6736(90)92827-5

305. **Shabani E, Ouma BJ, Idro R, Bangirana P, Opoka RO, Park GS, et al.** Elevated cerebrospinal fluid tumour necrosis factor is associated with acute and long-term neurocognitive impairment in cerebral malaria. *Parasite Immunol* (2017) 39: doi: 10.1111/pim.12438
306. **Grau GE, Taylor TE, Molyneux ME, Wirima JJ, Vassalli P, Hommel M, et al.** Tumor necrosis factor and disease severity in children with falciparum malaria. *N Engl J Med* (1989) 320:1586–1591. doi: 10.1056/NEJM198906153202404
307. **Pober JS, Cotran RS.** Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* (1990) 70:427–451. doi: 10.1152/physrev.1990.70.2.427
308. **Cavender DE, Edelbaum D, Ziff M.** Endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Am J Pathol* (1989) 134:551–560.
309. **Gimenez F, Barraud de Lagerie S, Fernandez C, Pino P, Mazier D.** Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci CMLS* (2003) 60:1623–1635. doi: 10.1007/s00018-003-2347-x
310. **Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G.** Tumor necrosis factor-alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* (1997) 150:1473–1486.
311. **Dunst J, Kamena F, Matuschewski K.** Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* (2017) 7:324. doi: 10.3389/fcimb.2017.00324
312. **Prakash D, Fesel C, Jain R, Cazenave P-A, Mishra GC, Pied S.** Clusters of cytokines determine malaria severity in Plasmodium falciparum-infected patients from endemic areas of Central India. *J Infect Dis* (2006) 194:198–207. doi: 10.1086/504720
313. **Li C, Sanni LA, Omer F, Riley E, Langhorne J.** Pathology of Plasmodium chabaudi infection and mortality in interleukin-10-deficient mice are ameliorated by anti-tumor necrosis factor alpha and exacerbated by anti-transforming growth factor beta antibodies. *Infect Immun* (2003) 71:4850–4856. doi: 10.1128/IAI.71.9.4850-4856.2003
314. **Sanni LA, Jarra W, Li C, Langhorne J.** Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with Plasmodium chabaudi. *Infect Immun* (2004) 72:3054–3058. doi: 10.1128/IAI.72.5.3054-3058.2004
315. **Kurtzhals JA, Adabayeri V, Goka BQ, Akanmori BD, Oliver-Commey JO, Nkrumah FK, et al.** Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet Lond Engl* (1998) 351:1768–1772. doi: 10.1016/S0140-6736(97)09439-7
316. **Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al.** Serum levels of the proinflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1beta), IL-6, IL-8, IL-10, tumor necrosis factor alpha, and IL-12(p70) in Malian children with severe Plasmodium falciparum malaria and matched uncomplicated malaria or healthy controls. *Infect Immun* (2004) 72:5630–5637. doi: 10.1128/IAI.72.10.5630-5637.2004
317. **Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Drayson MT, Molyneux ME, MacLennan CA.** Cytokine profiles in Malawian children presenting with uncomplicated malaria, severe malarial anemia, and cerebral malaria. *Clin Vaccine Immunol CVI* (2017) 24:e00533-16. doi: 10.1128/CVI.00533-16

318. **Pappa V, Seydel K, Gupta S, Feintuch CM, Potchen MJ, Kampondeni S, et al.** Lipid metabolites of the phospholipase A2 pathway and inflammatory cytokines are associated with brain volume in paediatric cerebral malaria. *Malar J* (2015) 14:513. doi: 10.1186/s12936-015-1036-1
319. **Armah HB, Wilson NO, Sarfo BY, Powell MD, Bond VC, Anderson W, et al.** Cerebrospinal fluid and serum biomarkers of cerebral malaria mortality in Ghanaian children. *Malar J* (2007) 6:147. doi: 10.1186/1475-2875-6-147
320. **Knackstedt SL, Georgiadou A, Apel F, Abu-Abed U, Moxon CA, Cunningham AJ, et al.** Neutrophil extracellular traps drive inflammatory pathogenesis in malaria. *Sci Immunol* (2019) 4:eaaw0336. doi: 10.1126/sciimmunol.aaw0336
321. **Yang JJ, Kettritz R, Falk RJ, Jennette JC, Gaido ML.** Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. *Am J Pathol* (1996) 149:1617–1626.
322. **Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA, Haslett C, Guthrie LA, Johnston RB, et al.** Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* (1986) 77:1233–1243. doi: 10.1172/JCI112426
323. **Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB.** Reactive Oxygen Species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal* (2014) 20:1126–1167. doi: 10.1089/ars.2012.5149
324. **Meager A.** Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* (1999) 10:27–39. doi: 10.1016/S1359-6101(98)00024-0
325. **Griffith JW, Sokol CL, Luster AD.** Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* (2014) 32:659–702. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145

ANNEXES

1. Protocole de phagocytose

Manipes préalables, à faire en continu

1) Purification et Enrichissement de culture parasitaire en souches exprimant des knobs par sédimentation de gélatine

1- Equipment

- Centrifugeuse

2- Matériels et réactifs

- Stades matures du parasite
- Gélatine (Sigma G2625)
- RPMI 1640 avec HEPES

3- Procédure

- Préparez de la gélatine à 0,7 % dans du RPMI 1640 avec de l'HEPES.
 - Peser 1,4g de gélatine de type A et ajouter 200mL de RPMI
- Chauffer et agiter la solution à 37 °C jusqu'à ce que la gélatine soit dissoute.
- Filtrez à 0,2µm-stérilisez la solution et conservez-la au réfrigérateur. Chauffez à 37 °C avant utilisation.
- Utiliser les stades matures du parasite. (Les ring, les stades erythrocytaires sans knobs et les rosettes couleront au fond.)
- Culotter la culture à 500 × g pendant 5 min
- Laver la culture une fois avec du RPMI 1640 à 500 × g pendant 5 min.
- Remettre en suspension le culot avec du RPMI 1640 à 50 % d'hématocrite.
- Ajouter dix volumes de solution de gélatine (Si 0,2 ml de suspension parasitaire, ajouter 2 ml de solution de gélatine à 0,7 %).
- Incuber le culot pendant 1 h à 37 °C. Les parasites matures restent dans la couche supérieure tandis que les érythrocytes non infectés et les parasites au stade anneau forment des rouleaux et descendent vers la couche inférieure.
- Retirer délicatement le surnageant, qui contient les parasites exprimant des knobs, sans toucher le culot et transférer dans un nouveau tube.
- Centrifuger le surnageant pour culotter les iE (2500 rpm 3min)
- Laver les parasites 3 fois avec du RPMI 1640.
- Préparer et lire un frottis sanguin
- Remettre les parasites en culture en utilisant du sang frais et du milieu (voir protocole culture parasitaire).

2) Purification et Enrichissement de culture parasitaire en ring par Sorbitol

- Préparer du sorbitol à 5%
 - Peser 5g de D-sorbitol (ref S1876 chez Sigma)
 - Ajouter 100mL de H₂O milliQ
 - Laisser jusqu'à dissolution complète
 - Chauffer à 37°C avant utilisation
- Culotter la culture à 500 × g pendant 5 min
- Ajouter goutte à goutte dix volumes de solution de sorbitol chauffé à 37 °C sur les GR (Si 0,2 ml de culot parasitaire, ajouter 2 ml de solution de sorbitol à 5%).
- Bien homogénéiser la suspension à la pipette en faisant des aspirations et refoulements.

- e) Incuber la suspension pendant 10min à 37 °C
- f) Taper avec les doigts fortement le tube
- g) Centrifuge 5min à 1600 rpm
- h) Retirer le surnageant (les formes jeunes sont contenues dans le culot)
- i) Laver le culot (formes jeunes des parasites) 3 fois avec du RPMI 1640.
- j) Préparer et lire un frottis sanguin
- k) Remettre les parasites en culture en utilisant du sang frais et du milieu (voir protocole culture parasitaire).

A préparer la veille de la manipe

1) Tous les milieux nécessaires pour les différentes étapes de la manipe

- Milieu de culture pour monocyte : 44 mL RPMI + 500 µL L-Glu + 500 µL Peni-Strepto + 5 mL FBS (10%)
- PBS sans Ca⁺⁺, sans Mg⁺⁺
- PBS stérile pH 7.4
- Méthanol pur
- CFSE
- Ac de marquage (CD14, CD16, live/dead)
- Giemsa dilué au 1:10 dans l'eau tamponné
- Blue trypan
- Paraformaldehyde (PFA) à 4 % dans du PBS, filtrer et conserver à 4 °C.
- Tube de GR sains à 2.5.10⁸ GRs/mL

2) S'assurer qu'on a le plastique et le matériel nécessaire

- Pipeteur, pipettes stériles
- Tubes de cytométrie
- Equipement MACS
- Bain marie
- Cellule KOVA
- Lames porte objet
- Plaques de culture 24 et 96 puits
- Tubes Falcon 15, 50 mL
- Agitateur orbital

3) Inactivation des plasmas pour l'opsonisation

- Pool de plasmas immuns = Pool de plasma J30 de patients NeuroCM : Mélanger 400 µL de plasma J30 de 10 patients NeuroCM.
- Pool de plasma non immun = Pool de plasma de patients toulousains : Mélanger 250 µL de plasma de 4 patients toulousains
- Inactiver les pools de plasmas (immuns et non immuns) en les chauffant à 56° pendant 45 min
- Faire des aliquots de 500 µL et garder à -20°

DATE DE LA MANIP :

I- MACS pour la sélection et concentration de parasites du stade mature

- Préparer les milieux nécessaires à la manipe (voir protocole MACS)
- Entretenir la souche de parasite (FcB1) jusqu'à maturation (au moins 50% de forme mature). **Voir protocole de culture parasitaire**

Parasitémie=

- Faire le Macs pour concentrer les formes matures de parasites. **Voir protocole de réalisation du MACS**
- Remettre en suspension. *Vol susp=*
- Faire un Frottis, colorer et calculer la parasitémie. *Nbre Gri=* *Nbre GRT=*
Parasitémie Frottis post MACS =
- Procéder à la numération des GRT (iE et uE) en déposant 10 µL de la suspension globulaire (possibilité de faire une dilution intermédiaire si le culot à la fin du MACS est important) dans une cellule de KOVA. Calculer le nombre total de GR, d'iE et d'uE.

Numération KOVA post MACS

Vol suspension=

Dilution pour compter=

Nbre GRT compté=

Nbre total GRT dans la suspension=

Nbre total iE dans la suspension=

- Adapter la suspension parasitaire à une concentration de 10^7 GRi/mL quelle que soit la parasitémie dans du milieu de culture pour parasite (**utiliser que du milieu de culture et non des uE**)
Rester sur la parasitémie finale pour marquer les GR

Vol MC parasite ajouté pour avoir 10^7 GRi/mL=V1=

Vol total suspension à 10^7 GRi/mL=V2=

Soit Y la quantité de GRs contenue dans 1mL à 10^7 GRi/mL de suspension à 10^7 GRi/mL.

$Y = 10^7 \cdot ((100 - \text{Parasitémie}) / 100) =$

Volume pour avoir Y GRs = $V_y = Y \cdot 10^{-7} =$ uL

- Besoin pour les tubes simple marquage
 - $2 \cdot 10^6$ GRi pour le tube de cytométrie SM CFSE
 - $2 \cdot 10^6$ GRi pour le tube de cytométrie SM HO
- Besoin pour traiter 1 patient (TnegPNO, TnegPO-1, TnegPO-2, PNO, PO) :
 - Y.GRs pour le tube témoins TnegPNO
 - Y.GRs pour le tube témoins TnegPO-1
 - $2 \cdot 10^6$ GRi pour le tube témoins TnegPO-2
 - $2 \cdot 10^6$ GRi pour le tube test PNO
 - $2 \cdot 10^6$ GRi pour le tube test PO
- Donc pour traiter 1 patient on a besoin de $2Y$.GRs (Ou), $6 \cdot 10^6$ Gri pour les tests et $4 \cdot 10^6$ Gri pour les tubes simple marquage.
- Pour traiter 4 patients on a besoin de $2Y$.GRs (Ou), $24 \cdot 10^6$ Gri pour les tests et $4 \cdot 10^6$ Gri pour les tubes simple marquage.
- Préparer un tube de GRs :
 - Préparer une suspension de 10 mL à 10^7 GRs/mL. Déposer 10uL de culot de GRs dans 10mL de MC
 - Numération des GRs en cellule Kova

<i>Dilution pour compter=</i>	<i>Nbre uE compté=</i>
<i>Nbre total uE dans la suspension=</i>	<i>Conc de la suspension=</i>
<i>Ajuster la conc à 10^7 GRs/mL. Vol MC parasite ajouté =V3=</i>	

II- Décongélation des PBMC de patients NeuroCM et incubation plaque ARN

- a) Préparer 4 tube(s) Falcon de 15 mL avec 10 ml de PBS sans Ca^{++} , sans Mg^{++} 2mMEDTA, 37°C (Nombre de PBMC à décongeler = nombre de tubes à préparer).
- b) Préparer une plaque 48 puits fonds plat « ARN » en indiquant les numéros de patients

- c) Décongeler les PBMC patients dans le bain marie à 37°C quelques min
- d) Transférer les PBMC dans les tubes de PBS correspondants
- e) Centri 1000 rpm 10 min, acc9, decc5
- f) Virer le surnageant et ajouter 2 mL de milieu de culture pour monocyte
- g) Compter les PBMC en cellule de KOVA. Faire une dilution au 1/10 en bleu trypan (5 µL de la suspension à 45 µL de bleu trypan) et ne compter que les cellules vivantes.
- h) Calculer le nombre de PBMC et ajuster les suspensions cellulaires à 2.10⁶ PBMC/mL
- i) Pour les PBMC patients, déposer 250 µL de suspension/puits (soit 500 000 PBMC/puits) dans la plaque ARN
- j) Incuber la plaque ARN 2h à 37°C 5% CO₂.

Début : **Fin :**
- k) Garder le reste des PBMC en tube dans du milieu à 37°C, 5% CO₂
 => On a x tubes de PBMC patients + 1 tube de PBMC EFS

Num patients	Vol susp/Dilution	Vivants/morts	PBMC vivants/mL	PBMC total	Vol MC pour 2.10 ⁶ PBMC/mL	Vol Final suspension
1-						
2-						
3-						
4-						

III- Marquage des GR au CFSE et au HO

- a) Préparer les tubes simple marquage
 - Déposer 2.10⁶ GRi soit 200uL de la suspension à 10⁷ GRi/mL pour le marquage HO= Tube 6
- b) Prélever 8Vy (V5) de la suspension à 10⁷ GRs/mL dans un tube de 50mL
- c) Prélever dans un tube de 50mL contenant 28M de Gri. V6= 2,8mL de la suspension à 10⁷ GRs/mL
- d) Ajouter 20uL de HO à 50ug/mL au Tube6 (Cf=5ug/mL)
- e) Préparez la solution stock de CellTrace™ immédiatement avant utilisation en ajoutant 18 µL de DMSO à un flacon de réactif CellTrace™ et bien mélanger (=> conc. Sol mère = 5 mM)
- f) Faire le marquage CFSE de l'ensemble des GRs (8.Vy=V5)
 - Ajouter un volume V7 de CFSE dans le tube de 50mL de manière à être à 5 µM final (dilution 1000x de la solution mère). **Vol CFSE=V7=(V5/1000)=**
Vol CFSE ajouté au contenu du tube de 50mL=uL
- g) Faire le marquage CFSE de l'ensemble des GRi (V6)
 - Ajouter un volume V8 de CFSE dans le tube de 50mL de manière à être à 5 µM final (dilution 1000x de la solution mère). **Vol CFSE=V8=(V6/1000)=2,8uL**
Vol CFSE ajouté au contenu du tube de 50mL=uL
- h) Homogénéiser et incuber les tubes avec CFSE pendant 20 minutes à 37°C, à l'abri de la lumière. Sur agitateur orbital à faible vitesse.

Début : **Fin :**
- i) Ajouter cinq volumes de milieu de culture pour parasites

Vol MC parasite à ajouter aux tubes de GRs= 5xV5= mL

Vol MC parasite à ajouter aux tubes de GRi= 5xV6= mL
- j) Incuber pendant 5 minutes, temp amb, obscurité

Début : **Fin :**
- k) Centrifuger les tubes 350g 3 min RT, et les remettre en suspension dans du milieu de culture pour parasites frais préchauffé
- l) Laisser reposer les tubes pendant 10 minutes Temp amb, à l'abri de la lumière

Début : **Fin :**

- m) Centrifuger les tubes 350g 3 min RT, et les remettre en suspension dans du milieu de culture pour parasites frais préchauffé (V5 et V6 respectivement)
- n) Préparation le tube simple marquage CFSE
 - Déposer 200µL de la suspension CFSE+ à 10^7 GRi/mL dans 1 tube pour SM CFSE = Tube5
- o) Préparation des tubes témoins Phago non opsonique et Phago opsonique
 - Déposer Y= GRs soit Vy= µL de la suspension à 10^7 GRs/mL dans 4 tubes pour les témoins négatifs phago non opsonique =TnegPNO= Tube 11, 12,13, 14
 - Déposer Y=. GRs soit Vy=. µL de la suspension CFSE+ à 10^7 GRs/mL dans 4 tubes pour les témoins négatifs phago opsonique =TnegPO-1= Tube 21, 22, 23, 24
 - Déposer 200µL de la suspension CFSE+ à 10^7 GRi/mL dans 4 tubes pour les témoins négatifs phago opsonique =TnegPO-2= Tube 31, 32, 33, 34
- p) Préparation des tubes tests Phago non opsonique
 - Déposer 200µL de la suspension CFSE+ à 10^7 GRi/mL dans 4 tubes= Tube 41, 42,43, 44
- q) Garder le reste de la suspension parasitaire dans le tube de 50mL pour les tubes phago opso, à l'obscurité. Calculer le volume restant dans le tube. $V9=2,8\text{mL}-1,8\text{mL}$ (car $9*200\text{uL}$ déjà prélevé)=1mL

Résumé des tubes de l'étape marquage CFSE :

- Tube SM CFSE (Tube 5) = 2.10^6 GRi CFSE+
- Tube SM HO (Tube 6) = 2.10^6 GRi + HO
- Tube TnegPNO (Tube 11, 12,13,14) = YGRs CFSE+
- Tube TnegPO-1 (Tube 21, 22, 23, 24) = YGRs CFSE+
- Tube TnegPO-2 (Tube 31, 32, 33, 34) = 2.10^6 CFSE+
- Tubes patients phago non opso (Tube 41, 42, 43, 44) = 200uL (2.10^6 Gri) de la suspension GRi CFSE+
- Tubes patients phago opso = Reste du contenu du tube de 50 mL marqué au CFSE

IV- Oponisation des GRi

- a) Préparation des tubes témoins Phago opsonique
 - Ajouter 20uL du pool plasmas immuns préalablement inactivé aux tubes TnegPO-1 (Tube 21, 22, 23, 24)
 - Ajouter 20uL du plasmas AB commercial préalablement inactivé aux tubes TnegPO-2 31, 32, 33, 34
- b) En fonction du volume restant (dans le tube de 50mL= $V9=1\text{mL}$) de la suspension parasitaire CFSE+, Ajouter le pool de plasma immun préalablement inactivé. Dilution au 1/10. Donc si 1 mL de suspension parasitaire, ajouter 100 µL de pool de plasma immun inactivé.

Vol restant dans le tube de 50mL= $V9=$
Vol pool Plasma immun ajouté= $V9/10=100\text{uL}$
- c) Homogénéiser les tubes et incubé 1 heure à 37°C à l'abri de la lumière sous agitation douce

Début : **Fin :**
- d) Laver avec 1 ml de RPMI- HEPES (350 g pdt 3 min RT) pour les tubes témoins et 5 mL pour le tube de 50 mL.
- e) Jeter le surnageant,
- f) Reprendre le contenu des tubes 21, 22, 23, 24 et 31, 32, 33, 34 dans 200uL de MC pour Mono
- g) Reprendre le contenu du tube de 50mL dans son volume initial **$V9=1\text{mL}$** . Utiliser le milieu de culture pour Mono

$V10=$ uL
- h) Distribuer 200uL (2.10^6 GRi) de la suspension CFSE+ contenue dans le tube de 50 mL dans des tubes de cytométrie pour Tubes patients phago opso (nombre de tube=nombre de patients) : Tube 51, 52, 53, 54
- i) Garder les tubes à l'abri de la lumière

Résumé des tubes de l'étape oponisation :

- Tube TnegPO-1 (Tube 21, 22, 23,24) = YGRs + CFSE + pool plasmas immuns
- Tube TnegPO-2 (Tube 31, 32, 33, 34) = 2.10^6 GRi + CFSE + plasmas AB commercial
- Tubes patients phago opso (Tube 51, 52, 53, 54) = 2.10^6 GRi + pool plasma immuns

V- Phagocytose

- a) Reprendre les PBMC (gardés à l'étuve) :

- Bien réhomogénéiser en insistant sur les bords du tube pour décoller les monocytes qui ont adhéré au plastique
- b) Pour la phago non opso + la phago opso :
- Ajouter 1 mL de la suspension cellulaire PBMC du patient 1 (soit $2 \cdot 10^6$ PBMC) aux tubes : (11, 21, 31, 41, 51)
 - Ajouter 1 mL de la suspension cellulaire PBMC du patient 2 (soit $2 \cdot 10^6$ PBMC) aux tubes : (12, 22, 32, 42, 52)
 - Ajouter 1 mL de la suspension cellulaire PBMC du patient 3 (soit $2 \cdot 10^6$ PBMC) aux tubes : (13, 23, 33, 43, 53)
 - Ajouter 1 mL de la suspension cellulaire PBMC du patient 4 (soit $2 \cdot 10^6$ PBMC) aux tubes : (14, 24, 34, 44, 54)
 - Homogénéiser et Incuber **40 min** à 37°C sur agitateur orbital dans un environnement 5% CO_2
 - Début :**
 - Placer les tubes sur de la glace pilée
 - Ajouter 2 mL de PBS 2mM EDTA froid et centrifuger à 350 g à 4°C pendant 5 min (pour stopper la phagocytose)
 - Jeter le surnageant
 - Fin :**

Liste des tubes pour phago non opsonique :

- Tube TnegPNO (Tube 11, 12, 13, 14) = YGRs CFSEpos + PBMC
- Tubes patients phago non opso (Tube 41, 42, 43, 44) = $2 \cdot 10^6$ Gri CFSEpos + PBMC

Liste des tubes pour phago opsonique :

- Tube TnegPO-1 (Tube 21, 22, 23, 24) = YGRs CFSEpos + pool plasmas immuns + PBMC
- Tube TnegPO-2 (Tube 31, 32, 33, 34) = $2 \cdot 10^6$ Gri CFSEpos + plasmas AB commercial + PBMC
- Tubes patients phago opso (Tube 51, 52, 53, 54) = $2 \cdot 10^6$ Gri CFSEpos + pool plasmas immuns + PBMC

VI- Marquage et cytométrie

- Préparer les tubes de cytométrie NM et SM :
 - Distribuer $2 \cdot 10^6$ PBMC soit 1mL de la suspension de PBMC ou de patients pour lequel il en reste, dans 4 tubes de cyto => NM (Tube 1), LD (Tube 2), SM CD14 (Tube 3), SM CD16 (Tube 4)
 - Les tubes SM CFSE (Tube 5) et SM HO (Tube 6) étaient déjà préparés
- Centri tous les tubes de cytométrie et Vider le surnageant par retournement
- Préparer le LD : nb de tubes (21) x 50 = X μl = 1,05mL. On met 0.5 μl /50 μl donc 10,5 de LD μl dans 1,05 mL de PBS-/. On ajuste en fonction du nb de tubes total (attention les tube NM, SM CFSE, SM CD14 et SM CD16 n'en contiendront pas).
- Ajouter 50 μl de la solution de LD/tube (attention les tube NM (Tube1), SM CFSE (Tube5), SM HO (Tube6), SM CD14 (Tube3), et SM CD16 (Tube4), n'en prendront pas).
- Vortexer et incuber 15 min à l'obscurité à T° ambiante
 - Début :**
 - Fin :**
- Laver avec 1mL de PBS1%SVF 2mM EDTA (300g 10min), Éliminer le surnageant
- Ajouter les Ac dans les SM :
 - SM CD14 (Tube 3): + 1 μL
 - SM CD16 (Tube 4): + 1 μL
 - Attention, ne pas mettre d'Ac dans le tube LD (Tube 2), NM (Tube 1) et SM CFSE (Tube 5), SM HO (Tube 6)
- Préparer le MIX d'Ac (volume final 100 μl) pour les tubes MIX. Soit N (20 tubes) le nombre de patient testé. (les tubes 11, 12, 13, 14, 21, 22, 23, 24, 31, 32, 33, 34, 41, 42, 43, 44, 51, 52, 53, 54) prendront le MIX d'Ac)

Pour le MIX		
Anticorps	Vol Ac pour 1 tube	Vol Ac pour 2N+4 tubes=
CD14 (1 μL /tube)	1 μL	20 μL

CD16 (1 uL/tube)	1 uL	20uL
Total PBS SVF	48uL	960

- Ajouter 50 µl de mix d'Ac/tube (attention les tube NM (Tube1), LD (Tube2), SM CFSE (Tube5), SM HO (Tube6), SM CD14 (Tube3), et SM CD16 (Tube4) n'en prendront pas).
- Vortexer et incuber 20 min dans l'obscurité, au frigo (4°)
- Rajouter 1 mL de PBS1%SVF 2mM EDTA, Vortexer
- Centrifuger (300 x g, 10 min), vider le surnageant
- Ajouter 300 µL de paraformaldéhyde (PFA à 4%), Vortexer
- Incuber 15min à Temp ambiante dans l'obscurité
- Ajouter 1mL de PBS-1%SVF 2mM EDTA
- Centrifuger et vider le surnageant en laissant environ 300uL de solution.
- Mettre à 4°C jusqu'au passage au cytomètre

Liste des tubes à passer en cytométrie:

- 1 tube non marqué NM : PBMC seuls = Tube 1
- 1 tube simple marquage LD : PBMC + LD = Tube 2
- 1 tube simple marquage CD14 : PBMC + CD14 = Tube 3
- 1 tube simple marquage CD16 : PBMC + CD16 = Tube 4
- 1 tube simple marquage CFSE : GRi + CFSE= Tube 5
- 1 tube simple marquage HO : GRi + HO= Tube 6
- 4 Tubes TnegPNO (Tube 11, 12, 13, 14) = YGRs + CFSE + PBMC
- 4 Tubes TnegPO-1 (Tube 21, 22, 23, 24) = YGRs + CFSE + plasmas immuns + PBMC
- 4 Tubes TnegPO-2 (Tube 31, 32, 33, 34) = 2.10⁶GRi + CFSE + plasmas AB commercial + PBMC
- 4 Tubes TestPNO (Tube 41, 42, 43, 44) = 2.10⁶GRi + CFSE + PBMC patients
- 4 Tubes TestPO (Tube 51, 52, 53, 54) = 2.10⁶GRi + CFSE + plasmas immuns + PBMC patients

N° patient	Tneg PNO	Tneg PO-1	Tneg PO-2	Tests PNO	Tests PO
Patient 1 :	Tube 11	Tube 21	Tube 31	Tube 41	Tube 51
Patient 2 :	Tube 12	Tube 22	Tube 32	Tube 42	Tube 52
Patient 3 :	Tube 13	Tube 23	Tube 33	Tube 43	Tube 53
Patient 4 :	Tube 14	Tube 24	Tube 34	Tube 44	Tube 54

VII- **Fin traitement plaque ARN (étude de l'expression des gènes en RT-qPCR)**

- a) A l'aide d'un cône de 1000 µL, récupérer le surnageant (cellules non adhérentes : lymphocytes). Transférer dans un cryotube de 1,5 mL étiqueté et conservé à -80°
- b) Ajouter 100 µL/puits de solution de lyse du kit extraction RNAqueous Micro Kit (Ref : AM1931)
- c) Faire des aspirations refoulements pour homogénéiser
- d) Transférer dans un tube eppendorf de 1,5 mL étiqueté
- e) Conserver à -80°C pour extraction ultérieure d'ARN

BMJ Open Identification of *Plasmodium falciparum* and host factors associated with cerebral malaria: description of the protocol for a prospective, case-control study in Benin (NeuroCM)

Valentin Joste,¹ Laurine Maurice,^{1,2} Gwladys I Bertin,¹ Agnès Aubouy,² Farid Boumédiène,³ Sandrine Houzé,^{1,4} Daniel Ajzenberg,³ Nicolas Argy,^{1,4} Achille Massougoudji,⁵ Ida Dossou-Dagba,⁶ Maroufou Jules Alao,⁷ Michel Cot,¹ Philippe Deloron,¹ Jean-François Faucher,^{3,8} on behalf of the NeuroCM group

To cite: Joste V, Maurice L, Bertin GI, *et al.* Identification of *Plasmodium falciparum* and host factors associated with cerebral malaria: description of the protocol for a prospective, case-control study in Benin (NeuroCM). *BMJ Open* 2019;**9**:e027378. doi:10.1136/bmjopen-2018-027378

► Prepublication history for this paper is available online. To view these files, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2018-027378>).

Received 25 October 2018
Revised 8 April 2019
Accepted 9 April 2019



© Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

For numbered affiliations see end of article.

Correspondence to

Valentin Joste;
valentinjoste@gmail.com
and Professor Jean-François Faucher;
jean-francois.faucher@unilim.fr

ABSTRACT

Introduction In 2016, an estimated 216 million cases and 445 000 deaths of malaria occurred worldwide, in 91 countries. In Benin, malaria causes 26.8% of consultation and hospitalisation motif in the general population and 20.9% in children under 5 years old. The goal of the NeuroCM project is to identify the causative factors of neuroinflammation in the context of cerebral malaria. There are currently very few systematic data from West Africa on the aetiologies and management of non-malarial non-traumatic coma in small children, and NeuroCM will help to fill this gap. We postulate that an accurate understanding of molecular and cellular mechanisms involved in neuroinflammation may help to define efficient strategies to prevent and manage cerebral malaria.

Methods and analysis This is a prospective, case-control study comparing cerebral malaria to uncomplicated malaria and non-malarial non-traumatic coma. This study takes place in Benin, precisely in Cotonou for children with coma and in Sô-Ava district for children with uncomplicated malaria. We aim to include 300 children aged between 24 and 71 months and divided in three different clinical groups during 12 months (from December 2017 to November 2018) with a 21 to 28 days follow-up for coma. Study data, including clinical, biological and research results will be collected and managed using CSOnline-Ennov Clinical.

Ethics and dissemination Ethics approval for the NeuroCM study has been obtained from *Comité National d'Ethique pour la Recherche en santé* of Benin (n°67/MS/DC/SGM/DRFMT/CNERS/SA; 10/17/2017). NeuroCM study has also been approved by *Comité consultatif de déontologie et d'éthique* of Institut de Recherche pour le Développement (IRD; 10/24/2017). The study results will be disseminated through the direct consultations with the WHO's Multilateral Initiative on Malaria (TDR-MIM) and Roll Back Malaria programme, through scientific meetings and peer-reviewed publications in scientific or medical journals, and through guidelines and booklets.

Strengths and limitations of this study

- This case-control study aims to identify the causative factors of neuroinflammation in the context of cerebral malaria.
- This study will inform on the aetiologies and management of non-malarial non-traumatic coma in small children.
- The final products of NeuroCM are expected to feed the pipeline of new therapeutical (immune intervention) and preventive (vaccine) strategies that will improve cerebral malaria outcome.
- This study does not have the power to investigate all aetiologies of fever in Benin. Contrary to the malaria groups, there is no information on the frequency of non-malarial non-traumatic coma admissions, and no certainty on the number of children who will be included in the non-malarial non-traumatic group.
- According to the limited number of patients, conclusions will further need to be confirmed in larger studies.

INTRODUCTION

Malaria is triggered by an apicomplexan parasite, *Plasmodium* spp. Six *Plasmodium* species can infect humans, with *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) being the most frequent in Sub-Saharan Africa (99.7% of estimated cases in 2017). *P. falciparum* is the agent of severe malaria and responsible for most malarial deaths.

In 2017, an estimated 219 million cases and 435 000 deaths of malaria occurred worldwide, in 91 countries.¹ Despite a recent decrease in malaria mortality due to extensive malaria control through insecticide impregnated bednets and increased use of

Table 1 Clinical and laboratory criteria for severe malaria (from (4))

Clinical manifestations	Prognosis value	Frequency in children
Impaired consciousness	+++	+++
Respiratory distress	+++	+++
Multiple convulsions	+	+++
Prostration	+	+++
Shock	+++	+
Pulmonary oedema (radiology)	+++	+/-
Abnormal bleeding	+++	+/-
Jaundice	++	+
Laboratory indices	Prognosis value	Frequency
Severe anaemia (haemoglobin <5g/dL or haematocrit <15%)	+	+++
Hypoglycaemia (<40mg/dL)	+++	+++
Acidosis (bicarbonate <15mM)	+++	+++
Hyperlactataemia (lactates >5mM)	+++	+++
Renal impairment (creatinin >3mg/dL)	++	+
Hyperparasitaemia (parasitaemia >10%)	+/-	++

artemisinin derivatives, 275 000 children still die every year from malaria. Most cases and deaths were in African region (respectively 92% and 93%). Severe malaria occurs mostly in non-immune patients and in Sub-Saharan Africa and 90% of severe malaria affect young children.² In endemic states, malaria is one of the three major causes of hospitalisation in children under 5 years old.

Benin is in West Africa, along the Gulf of Guinea. In 2018, 11.5 million people live in Benin, most of them in South Benin. Malaria transmission occurs seasonally, during rainy seasons (from May to August and October). According to the Beninese health department in 2016, malaria is responsible for 26.8% of disease reports in consultation and hospitalisation in the general population and for 20.9% in children under 5 years old.³ It is also the first morbidity cause in the general population with a prevalence of 39.7% in 2013, followed by respiratory infections in 12.4% cases and gastro-intestinal disease for 6.4%.⁴

According to the WHO, severe *falciparum* malaria is defined by the association between *P. falciparum* asexual parasitaemia and the presence of one or more of the clinical or laboratory features (with no other confirmed cause for their symptoms) presented in table 1. Cerebral malaria (CM) is defined by the presence of asexual form of *P. falciparum* associated with Blantyre score ≤ 2 (table 2). CM is a coma which persists for >1 hour after a seizure irrespective of anticonvulsant medications. Clinical criteria for CM diagnosis are currently debated,

Table 2 Blantyre score (from (4))

	Score
Best motor response	
Localises painful stimulus	2
Withdraws limb from pain	1
Non-specific or absent response	0
Verbal response	
Appropriate cry	2
Moan or inappropriate cry	1
None	0
Eye movement	
Directed	1
Not directed	0
Total	0–5

and it has been highlighted that a *P. falciparum* parasitaemia can be observed in comatose children with coma related to a non-malarial central nervous system disease,⁵ leading to a possible overestimation of CM cases. A recent study in Malawi found that 25% of CM cases were misdiagnosed and that many children may have had a viral meningoencephalitis concomitant to a malarial infection.⁵ Implementation of fundoscopic examination (in order to look for malaria retinopathy signs)⁶ and microbiological investigations (blood culture, cerebrospinal fluid (CSF) culture, CSF multiplex polymerase chain reaction (PCR)) could limit the overestimation of CM diagnosis, but fundoscopic examination requires trained physicians and microbiological investigations are expensive. Clinical research needs to focus on new clinical or diagnostic tools designed to help physicians in order to better diagnose CM.

NeuroCM study aims to collect data (such as blood and cerebrospinal fluid culture, fundoscopic examination) on coma's aetiologies in Beninese young children.

Without treatment, CM is invariably fatal. Even with parenteral artemisinin use, severe malaria death rate is 20%.⁷ In case of severe malaria or CM, patients should be hospitalised in an intensive care unit. Consciousness status, blood pressure, heart and respiratory rates, diuresis and oxygen saturation have to be monitored every 6 hours.⁸ Parenteral artemisinin instead of quinine is recommended at a posology of 2.4mg/kg by injection (3mg/kg in children under 20kg of body weight) at diagnosis, 12 and 24 hours later and then daily until patients can take oral drugs.⁷ Benzodiazepine should be used to treat convulsions (diazepam 0.3mg/kg, midazolam or lorazepam). It seems accepted that CM surviving patients generally do not present any neurological sequelae and fully recover their neurological capacity. However, immediate neurological after-effect is described in 6.7% to 11.6% of cases^{7,9} and a recent meta-analysis found a relation between CM and neurological disease.¹⁰ The

NeuroCM study will collect data on children's clinical recovery at discharge and 21 to 28 days later.

Tools for malaria control are less and less effective. On one hand, *P. falciparum* drug resistance is a growing concern. Resistance to chloroquine, one of the main anti-malarial drugs, appeared during the sixties in South-East Asia and then spread to Africa.^{11 12} Artemisinin-combined therapy became the treatment of choice for malaria with the aim to reduce the risk of parasites developing resistance,¹³ but resistance appeared in South-East Asia in 2008¹⁴ and was confirmed in others studies.¹⁵ It has not, hitherto, spread to Africa but this is a real concern for the WHO.¹⁶ On the other hand, mosquitos become more and more resistant to insecticides, making antivectorial prevention more and more difficult.¹⁷ Thus, research for new therapies is needed.

Pathophysiology of CM is complex and multifactorial, based on both parasite and host immune factors. It is currently believed that CM is caused by dedicated parasite variants that specifically localise in brain through interaction between parasite proteins expressed on the surface of the infected erythrocytes (iE) and brain endothelium. This sequestration occurs with erythrocytes infected with late stage of *P. falciparum* (trophozoites and schizonts). Binding of iE to endothelial vascular cells is mediated by variant surface antigens (VSA). *Plasmodium* virulence is linked to its ability to express VSA.¹⁸ VSA include three different multigenic families: *var*, *rifin* and *stevor*. More specifically, *var* genes coding for *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) proteins are highly polymorphical and present in sixty copies in *P. falciparum* genome. Those PfEMP1 are expressed on iE surface and are responsible for endothelial receptors binding, such as chondroitin sulfate A (CSA) and endothelial protein C receptor (EPCR) or intercellular adhesion molecule (ICAM) respectively involved in placental malaria¹⁹ and severe malaria.²⁰ PfEMP1 family has been clearly associated with binding of iE to the microvascular endothelium of every organ and tissue.²¹ We now better understand iE's binding on placenta²² and vaccine development to prevent gestational malaria seems an achievable goal. By contrast, research is still needed to understand which type of proteins specifically binds to cerebral endothelial receptor. In a previous study conducted in Benin, we identified several proteins associated with CM.²³

The finding of a PfEMP1 variant specifically related to CM could pave the way to the development of a vaccine targeting this specific protein. Studying the transcriptomic and proteomic profiles of plasmodial strains involved in CM compared with strains involved in uncomplicated malaria (UM) is a first step to better understand related mechanisms to cerebral endothelium binding.

The host immune aspect of the pathophysiology of CM are the consequences of microvascular sequestration of iEs and rosettes (non-infected red blood cells) in brain. Such sequestration leads to blood flow obstruction, ischaemia/hypoxia and local inflammation resulting in neuroinflammation.²⁴⁻²⁸ The way this cascade of events

is linked and the reasons why they result in death or inflammation resolution remains to be elucidated. Acute cerebral ischaemia is known to drive microglia activation and influx of myeloid immune cells to the brain. Resident microglia and infiltrating monocytes/neutrophils have a critical role in initiating, sustaining (M1 polarisation) and resolving (M2 polarisation) post-ischaemic inflammation.²⁹⁻³¹ Another important immune aspect of neuroinflammation during CM is redox equilibrium. The production of reactive oxygen species both by parasites (haemoglobin digestion) and monocytes/macrophages are thought to cause damages to neurons.³² This process leads to blood-brain barrier (BBB) permeability and neurodegeneration.^{33 34} In order to counterbalance the excess of oxidants, oxidant scavengers and antioxidant enzymes may be produced. NO bioinsufficiency and subsequent vasoconstriction constitute other important aspects of CM pathophysiology.³⁵ Haem and superoxide anion release during infection leads to NO mobilisation for detoxification, depriving vascular smooth muscle cells in NO and leading to inflammation-related vasospasm.^{35 36} Although vasospasm has not been clearly associated to death risk during CM,³⁷ NO pathway deserves a better understanding during CM pathophysiology. In the NeuroCM study, we intend to better understand mechanisms of neuroinflammation and its resolution in a context of CM, by comparing data collected in children presenting with CM, in children hospitalised for non-malarial non-traumatic coma and in children with UM. We will focus our studies on markers of immune cell migration and polarisation (towards inflammatory or resolute phenotypes), of pro- or anti-oxidant response and of pro- or anti-inflammatory response through urine and blood samples analysis at inclusion, 3 and 21 to 28 days post-inclusion.

STUDY OBJECTIVES

The main objective is to identify the causative factors of neuroinflammation in the context of CM. There are currently very few systematic data from West Africa on the aetiologies and management of non-traumatic coma in small children, and NeuroCM will bring new information on these aspects. We postulate that an accurate understanding of molecular and cellular mechanisms involved in neuroinflammation may help to define efficient strategies to prevent and manage CM.

There are three distinct objectives in this study.

To identify parasitological factors associated with *P. falciparum* CM or UM

We expect to identify and validate *P. falciparum* virulence factors associated with CM by comparison with UM. Once proteins of interest will be found, functional studies will help to better understand their role in CM.

To identify immune host factors associated with fatal or favourable outcome of CM

We expect to better understand which mechanisms trigger neuroinflammation and its resolution during CM by comparing three groups of children: presenting with CM, hospitalised for non-malarial non-traumatic coma and presenting with UM. We aim to identify therapeutic molecular targets involved in neuroinflammation resolution.

To describe coma's aetiology in Sub-Saharan Africa

We expect to improve knowledge in non-malarial non-traumatic coma's aetiologies in Sub-Saharan Africa in order to improve young children's coma management and inform health public policies on the role played by infections that could be prevented by vaccination.

METHODS AND ANALYSIS

Design

This is a prospective, case-control study comparing CM to UM and non-malarial non-traumatic coma. Patients will be recruited in South Benin, in two different hospitals for coma and in a dispensary for UM, as UM is rarely detected in hospitals where children with coma are managed. This study is conducted by one Beninese research team (CERPAGE, Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance) and three French research teams (UMR D216 MERIT in Paris carrying the project, UMR D152 PHARMADEV in Toulouse, UMR S1094 NET in Limoges).

Study environment

This study takes place in Benin, precisely in Cotonou and Calavi for the hospital's recruitment. UM recruitment takes place in Sô-Ava district. Cotonou is the largest city and economical centre of Benin, with an estimated population of 679 012 habitants in 2013.

The two recruitment hospitals are the CHU-MEL (CHU-Mère et Enfant de la Lagune) and Hôpital de zone de Calavi. Routine laboratory analysis, except bacteriology, are performed on site for children included with coma and at IRCB (Institut de Recherche Clinique du Bénin) for children with UM. Bacteriological analyses are performed in the microbiology laboratory of CNHU (Centre National Hospitalier Universitaire). Research analyses are done in the CERPAGE laboratory.

Participants

We aim to include three different clinical groups of 100 children between 24 and 71 months during 12 months (from December 2017 to November 2018). This duration has been determined according to previous studies in Benin.³⁸

In the **first group**, a diagnosis of CM will be defined as follows: positive *P. falciparum* thin blood smear with a Blantyre score ≤ 2 with exclusion of patients presenting: positive bacteraemia, meningitidis proved or suspected (leucocytes in cerebrospinal fluid >1000 per microlitre and/or Gram positive in CSF and/or CSF bacterial

culture positive and/or PCR positive for any bacteria or virus).

In the **second group**, a diagnosis of non-malarial non-traumatic coma will be defined as follows: Blantyre score ≤ 2 and no *Plasmodium* infection as detected by thin blood smear.

In the **third group** UM will be defined as follows: (1) fever at inclusion or within 24 hours before, (2) no clinical or biological sign of severe malaria (table 1), no danger signs and no other obvious cause of fever and (3) *P. falciparum* parasitaemia between 1000 to 500 000 parasites per microlitre.

Inclusion and exclusion criteria

For all children, the first inclusion criterion is parental acceptance that their child participate in the study after information has been given (see section 'Ethics and safety considerations'). Inclusion criteria for coma (CM and non-malarial non-traumatic coma) are: age between 24 to 71 months, Blantyre score ≤ 2 , negative HIV rapid diagnostic test (RDT). Non-inclusion criteria are: pre-existent neurological disease and traumatical or toxical coma.

Inclusion criteria for UM are: age between 24 to 71 months, fever $>38^{\circ}\text{C}$ at inclusion or within 24 hours before and no clinical severity/danger sign, positive malaria RDT and negative HIV RDT.

Exclusion criteria for coma are: thick and thin blood smear not realised at day 0 (D0) and/or biological blood test not realised at D0 and/or research blood test not realised at D0.

Exclusion criteria for UM are: thick and thin blood smear not realised at D0 and/or biological blood test not realised at D0 and/or research blood test not realised at D0 and/or laboratory indices for severe malaria and/or thick and thin blood smear negative for *P. falciparum* and/or parasite density under 1000 parasite per microlitre or higher than 500 000 parasites per microlitre. To evidence a significant difference between CM and UM groups in the ratio of endogenous mediators associated with inflammation resolution, we estimated that a sample size of 100 subjects per group was sufficient to reach the main study target, that is, by linear regression analysis involving a maximum of six predictors and an R^2 value of 0.400, ensuring an 80% power and a 5% probability of type I error. This sample size also complies with the requirements of the reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis used to validate the discrimination of CM and UM samples obtained by SARTools, and finally with the overall funding request of the project.

Recruitment process

Step 1: enrolment/screening

For CM and non-malarial non-traumatic coma group, every young child with neurological symptoms is screened for eligibility. For UM group, every child presenting at the outpatient clinic with fever or fever during the previous 24 hours is screened. The first step is patients' screening to confirm study eligibility and provide participants with

information about the study. A questionnaire assessing eligibility will inform on home addresses, sociodemographical data (number of children in the family, ethnical group...), clinical history, use of mosquito net and vaccination status. Informed consent is then obtained from the parents or caregivers.

The following tests are performed to screen for malaria and to rule out HIV infections: a RDT detecting histidin-rich protein 2 (HRP2) for *P. falciparum* detection and Determine HIV-1/2 set, Alere for HIV detection.

Step 2: clinical examination and biological sample/analysis

A clinical examination is performed by a study physician for children hospitalised with coma, and by a study nurse for UM. In the coma group, a fundoscopic assessment is performed (Eyepax 1.0 Dioptrix) and pictures are captured and downloaded on an online database. The clinical data entry is performed on an online case report form.

In order to allocate children to their respective groups, biological analyses according to severe malaria are needed. For coma's inclusion: thick and thin blood smear analysis, complete blood count (CBC) (Sysmex KX-21N, Sysmex XT-1800i and ABS Micro ES 60), biochemistry analysis (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺, HCO₃⁻, albumin, urea, creatinine, glucose, lactate) with Piccolo Sysmex and ALAT plus bilirubin (Biolabo Kenza Max biochemistry and Mindray BS-200) are performed on site. Blood culture, Gram staining and bacterial culture for CSF are realised in a university hospital reference laboratory. Biomérieux Biofire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel multiplex PCR (looking for *E. coli*, *H. influenzae*, *L. monocytogenes*, *N. meningitidis*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, cytomegalovirus, enterovirus, Epstein-Barr virus, herpes simplex virus (HSV) 1, HSV2, human herpesvirus 6, paraechovirus, varicella zona virus and *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*) will be further performed in France. The required following samples are needed: one Etylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) tube (2 mL) for CBC and malaria diagnostic, one heparin tube (2 mL) for biochemistry analysis, one cerebrospinal sample (1 mL), one blood sample for blood culture (5 mL) for routine analyses, two additional EDTA tubes (6 mL) and 50 mL of urine for research analyses.

For UM inclusions: severe malaria was ruled out according to results from blood cell count (Sysmex XS500i), biochemistry analysis (bilirubin, glucose, creatinine) on Selectra pro automate (Elitech group) and thick and thin blood smear. The following samples are needed: one EDTA tube (2 mL), one heparin tube (2 mL) and one fluorinated tube (2 mL) for routine analyses, two additional EDTA tubes (6 mL) and 50 mL of urine for research analyses.

Step 3: research analyses

A part of research analyses is realised in CERPAGE laboratory. Blood, 1 to 1.5 mL, is cultured in supplemented Roswell Park Memorial Institute 1640 medium

with Albumax (Gibco) for less than 48 hours until parasites reach the mature stage (from young trophozoite to schizont), then purified using magnetic-activated cell sorting (MACS; Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) for binding and endothelial cell activation assay. The resulting mature stage are stored at -80°C for further mass spectrometry protein analysis. Whole blood samples of 200 µL are conserved at -20°C for DNA analysis, 200 µL are transferred in TRIzol reagent (Life technologies, France) and stored at -80°C for further RNA extraction³⁹ and 200 µL in liquid nitrogen for parasite cryoconservation. Plasma samples are conserved at -20°C and -80°C respectively for immune response analysis and dosage of biomarkers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are separated from red blood cells by Ficoll density gradient and stored in liquid nitrogen. Finally, urines are stored at -80°C for further analysis. See [table 3](#) for detailed research planning.

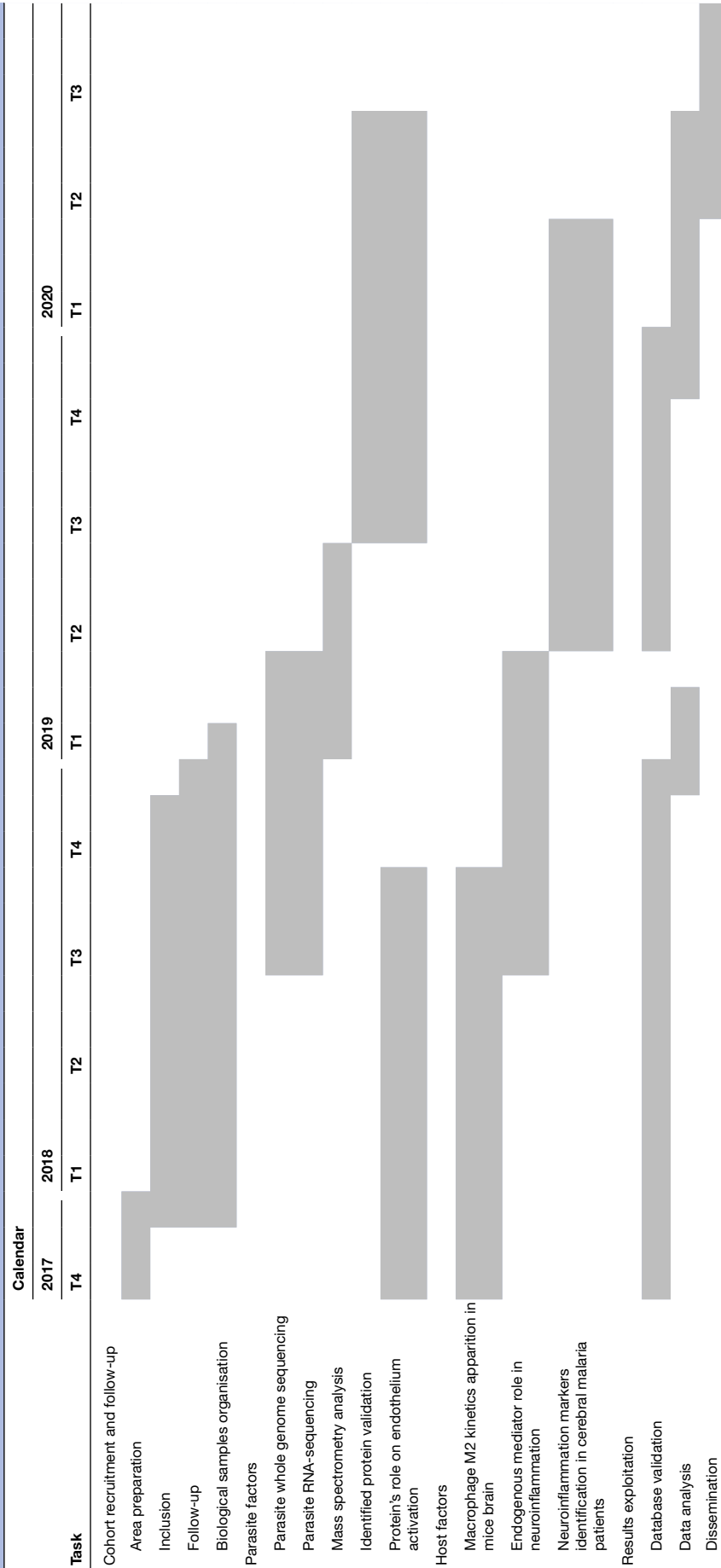
Parasite factors analyses will be performed in several ways. We will compare CM and UM isolates with whole genome DNA sequencing; RNA-sequencing and by quantitative MS analysis. Highly polymorphical *var* genes will be assembled and BLASTed against peptide hits from the MS approach. Nucleotide primers will be designed with DNA-sequencing data and used in RT-qPCR to validate the RNA-seq data. Associations between gene polymorphisms and modifications in RNA nature and quantity detected by RNA-seq will be investigated. Then, we will use recombinant protein and *P. falciparum* genome modification by gene disruption to study proteins' role.

Host factors study will be based on the analysis of PBMC, plasmas and urine samples of the three groups of children. PBMC analysis will focus on the phenotyping of monocytes to distinguish M1 and M2-like phenotypes. Flow cytometry will be used to measure expression levels of CD11b and CD16 as M1 markers, and CD163 and CD206 as M2 markers. The assessment of gene expression levels of cytokines, chemokines and their receptors by RT-qPCR will complete phenotype analysis. Plasmas and urine samples will allow to measure redox (L-arginine and biopterins), pro-/anti-inflammatory (cytokines, chemokines and lipid mediators such as eicosanoids) and pro-resolving mediators (such as prostaglandins and lipoxins) by ELISA or EIA. We will first compare data from the group of CM to the two other groups in order to identify the biological markers best related to inflammation and neurological impairment during CM. Second, we will analyse data obtained with the two coma groups at inclusion (Day 0), at Day 3 and Day 30 to understand the kinetics of immune events and its relation to death or favourable outcome. Finally, we will search for severity and death risk factors within the CM groups.

Step 4: coma follow-up

In children presenting with coma, both clinical data and blood samples are collected at day 3 (D3) and day 21 to 28 (D21-28) on disease outcome, and for research purpose. One EDTA tube (6 mL) and 50 mL urine will be sampled.

Table 3 Detailed research planning



In order to prevent losses, parents/guardians are called a few days before D21-28 to remind them of follow-up visit. No follow-up visit is scheduled for children with UM.

Data management

Data, including clinical, biological and research results are collected and managed using CSONline-Ennov Clinical (<https://ufrcb.chu-limoges.fr/crfonline/>). It is a secure, web-based application designed to support data capture for research studies. Study participants are identified by a code and have their own account. The two physicians and the nurse were trained to entry the data on included children in the database. Nobody can delete a patient created in the base, except the data manager.

Data & Safety Monitoring Board, composed by two physicians specialised in infectious disease and one statistician, will review allocation of children to the pre-defined study groups and discuss possible deviations from the expected number of subjects in the groups.

Data analysis

In a first step, descriptive statistics will be realised by calculating mean and SD for quantitative variables, and proportion for qualitative variables to determine the main characteristics of the three clinical groups.

Focusing on cerebral malaria and UM children the MS/MS data will be searched against the databases (UNIPROT and PlasmoDB,⁴⁰ the proteins will be considered as positive hits with at least two peptides. The MaxQuant software will be used to compare malaria protein expression between isolates of these two clinical groups. Transcriptomical data will be analysed with Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) and R software (<https://www.r-project.org/>).⁴¹ The raw data will be trimmed with Trimmomatic tool for Phred Quality Score $Q_{score} > 20$, read length > 30 bases and ribosome sequences will be removed with tool sortMeRNA. Reads will be mapped against the *P. falciparum* 3D7 reference genome combined with *var* transcript sequences from 7 *P. falciparum* genomes. Differential expression analysis on RNAseq data will be performed using the DESeq2⁴² package considering a one log-fold increase as significant using adjusted p value < 0.05 . Data normalisation will be realised with DESeq2 software, with hypothesis that there exists genes overexpressed and underexpressed and that majority of genes are not expressed in a differential way. Transcript expression levels (evaluated with RT-qPCR) will be compared by t-tests and analysis of variance of transformed outcomes.

Regarding immune response analysis, potential markers related to inflammation and neurological symptoms will be compared using variance analysis in samples from children from the three groups, CM, UM and non-malarial non-traumatic group. The groups will be compared two by two with a linear regression, with a special attention to CM/UM comparison. Adjustment variables such as age, sex, ethnical group, time to hospital transfer, body temperature and co-morbidities will be taken into account in the model. The threshold for significance level will be

0.05, and a Bonferroni correction will be applied to take into account multiple testing. It will be further determined if a global comparison between the three groups will be made. Generally speaking, the non-malarial non-traumatic coma group will be used as a comparator to analyse specific effect of malaria in neuroinflammation development. The second major question to be answered to is, within the CM group, whether the changes of the inflammation markers between D0 (admission) and D3 are predictive of the outcome (survival/death). A logistical model (univariate then multivariate) will be used for this analysis. The same adjustment variables will be used as in the comparison between groups. The dependent variable will be the outcome survival/death.

The last model (also a logistical regression) will study the changes in inflammation markers between D3 and D21 in the survivors in order to determine if they are predictive of a favourable evolution. The dependent variable will be the outcome, here the discharge from the hospital without apparent sequelae.

Missing data are not expected to affect more than 10% of the records for the main factors that will be analysed. Should they be over 5%, an imputation method such as the minimum information for publication of quantitative real time pcr experiments (MIQE) method will be applied, as the errors can be considered at random.⁴³ No proteomic analysis for immune marker will be done.

Patient and public involvement

From patients' experience and preference, follow-up of children admitted with coma was scheduled in order to be able to detect neurological sequelae. The diagnostical workup proposed to all children included into the study, although not affordable to all patients in routine practice, met parent's expectations on what health facilities should provide to all patients. All patients were recruited in health facilities where they usually seek care, and to that respect patients were involved in their recruitment process. Finally, results will not be disseminated directly to study participants but through peer-reviewed scientific journal and conference presentations.

ETHICS AND DISSEMINATION

Safety considerations

Parents/guardians will be given an oral information by the physician or the nurse and an opportunity to ask question and refuse the protocol. Patient's confidentiality will be ensured and anonymity guaranteed by anonymous coding given at the inclusion.

Dissemination

The main benefits of NeuroCM are targeted on people living in malaria endemic countries. The study results will be disseminated through a variety of instruments to ensure that a broad range of both specialists and non-specialists are informed and can properly benefit from the findings. First, through the direct consultations with the WHO's

TDR-MIM, Roll Back Malaria programme to reach the wider public health audience; through scientific meetings and peer-reviewed publications in scientific or medical journals to reach the scientific/medical/public health communities; through guidelines targeting the medical and paramedical staff for optimisation of severe malaria management, through booklets (eg, first aid procedures and adapted behaviour in case of emergency) elaborated and adapted to the population of Benin.

DISCUSSION

CM is the most life-threatening form of malaria with high mortality rate in young children. Mortality related to malaria is still high in children population and accurate CM diagnosis remains challenging. Among CM surviving children, up to 25% have long-term neuro-cognitive deficits (visual/hearing/cognitive/language impairment/ataxia/hemiparesis/motor deficit...), and 10% show evidence of mental health disorders.⁴⁴ As CM might be one of the more common causes of epilepsy in malaria-endemic regions, the burden of CM neurological sequelae may be largely underestimated, but difficult to estimate because diagnosis is challenging in malaria-endemic regions. Bacterial or viral central nervous system infections may occur in children with malarial infection; this may not only originate overdiagnosis of CM, but also may overlook potential bacterial and viral central nervous system infections.

Patients were included in different areas reflecting the healthcare system in Benin. UM patients could not be included in hospital centres such as the CHU-MEL (Cotonou) hospital, and Calavi's hospital, because outpatients with UM rarely seek care in these centres. In 2014, a pilot study aimed to include UM patients in the Cotonou CHU-MEL, and highlighted the absence of UM cases in hospitals. However, patients from the Sô-Ava areas are referred to the main hospital centres when patients present severe malaria (or any severe illness that cannot be monitored and managed in dispensary). In 2016, we aimed to include patients suffering from cerebral malaria in the Sô-Ava, and realised that first, patients were directly sent to the main hospitals, and second, that it would not be ethical to include severe malaria cases in these health structures due to the facility itself. A multicentre study for UM cases inclusion, using the main patient's origin from the corresponding hospital, would have been more even accurate. This represents a possible limitation of our study.

The expected impact of NeuroCM is of great magnitude. First, NeuroCM is an attempt to propose improvements for the diagnosis of CM. It will provide as far as possible, for the first time in West Africa, an identification of the causes of coma in the study area. Second, thanks to DNA, RNA and protein analyses, NeuroCM will allow to identify new parasite targets for a vaccine to prevent CM. Third, NeuroCM will provide data on the kinetics of appearance of inflammatory and pro-resolving molecular

and cellular events in brain during CM. The role of endogenous mediators in neuroinflammation resolution during CM will be clarified, with emphasis on pro-oxidant components and lipid mediators. NeuroCM will also identify markers allowing the definition of an immunological state in the process of neuroinflammation resolution in CM patients. Our experimental murine model will allow the formulation of new hypothesis while proof of concept will be achieved through the correlation of our proposed targets with patient morbidity and mortality parameters. In the future, it may allow clinicians to better manage CM, with specific pro-resolving drugs for instance.

The final products of NeuroCM are expected to feed the pipeline of new therapeutical (immune intervention) and preventive (vaccine) strategies to improve CM outcome, as well as other diseases involving neuroinflammation.

Author affiliations

¹MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, 75006, Paris, France

²PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France, Toulouse, France

³Tropical Neuroepidemiology, INSERM UMR 1094, Limoges, France

⁴Parasitology Laboratory, Hopital Bichat - Claude-Bernard, Paris, France

⁵Institut de Recherche Clinique du Bénin, Calavi, Benin

⁶Paediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin

⁷Paediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin

⁸Infectious diseases and tropical medicine department, Limoges University Hospital, Limoges, France

Collaborators NeuroCM group: Dissou Affolabi (Paediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin); Hélène Authier (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France); Linda Ayedadjou (Paediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHU-MEL), Cotonou, Benin); Bibiane Biokou (Paediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, Benin); Agnès Coste (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France); Jean-Eudes Degbello (Institut de Recherche Clinique du Bénin (IRCB), Calavi, Benin); Latifou Dramane (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris); Sayeh Jafari-Guemouri (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Claire Kamaliddin (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Elisée Kinkpe (Paediatric Department, Calavi Hospital, Calavi, Benin); Anaïs Labrunie (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France); Yélé Ladipo (Paediatric Department, Mother and Child University and Hospital Center (CHUMEL), Cotonou, Benin); Thomas Lathiere (Ophthalmology department, Limoges University Hospital, Limoges, France); Audrey Mowendabeka (Paediatric Department, Hopital de la Mère et de l'Enfant, Limoges, France); Jade Papin (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Bernard Pipy (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France); Pierre-Marie Preux (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France); Marie Raymondeau (NET, INSERM, Université de Limoges, Limoges, France); Jade Royo (PHARMADEV, Université de Toulouse, IRD, UPS, France); Darius Sossou (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris); Brigitte Techer (MERIT, Sorbonne Paris Cité, IRD, Paris, 75006, France); Bertin Vianou (Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HP, Hôpital Bichat, Paris).

Contributors VJ and JFF drafted the manuscript. GB, AA, SH, DA, NA, MC, PD and JFF revised the manuscript. GB, AA, FB, SH, DA, NA, MC, PD and JFF designed the study. VJ and LM organised the study in the field. AM, IDD and JA implemented the study in the field. All members of the NeuroCM group have substantially contributed to the conception, design or organisation of the study. All authors approved the final version to be submitted to the journal.

Funding This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche, under contract ANR-17-CEI 7-0001-01.

Competing interests None declared.

Patient consent for publication Not required.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Open access This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which

permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

REFERENCES

- World Health Organization. World malaria report. 2018 <https://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2018/en/>.
- Black RE, Cousens S, Johnson HL, *et al*. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 2010;375:1969–87.
- Beninese health department. Annuaire des statistiques sanitaires. 2016 http://www2.sante.gouv.bj/IMG/pdf/annuaire_stat_pas_2016.pdf.
- World Health Organization. Stratégie de coopération de l'OMS avec le Bénin: 2016-2019. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/246191>.
- Mallewa M, Vallely P, Faragher B, *et al*. Viral CNS infections in children from a malaria-endemic area of Malawi: a prospective cohort study. *Lancet Glob Health* 2013;1:e153–60.
- Beare NA, Taylor TE, Harding SP, *et al*. Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:790–7.
- Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, *et al*. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet* 2010;376:1647–57.
- World Health Organization. *La prise en charge du paludisme grave - guide pratique*. Troisième édition.
- Severe malaria. *Trop Med Int Health* 2014;19(Suppl 1):7–131.
- Christensen SS, Eslick GD. Cerebral malaria as a risk factor for the development of epilepsy and other long-term neurological conditions: a meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2015;109:233–8.
- Wernsdorfer WH. The development and spread of drug-resistant malaria. *Parasitol Today* 1991;7:297–303.
- Mengesha T, Makonnen E. Comparative efficacy and safety of chloroquine and alternative antimalarial drugs: a meta-analysis from six African countries. *East Afr Med J* 1999;76:314–9.
- World Health Organization. WHO calls for an immediate halt to provision of single-drug artemisinin malaria pills. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr02/en/>.
- Noedl H, Se Y, Schaefer K, *et al*. Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia. *N Engl J Med* 2008;359:2619–20.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, *et al*. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med* 2009;361:455–67.
- World Health Organization. Status report on artemisinin resistance and ACT efficacy. <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin-resistance-august2018/en/>.
- World Health Organization. Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010-2016. <http://www.who.int/malaria/publications/9789241514057/en/>.
- Kraemer SM, Smith JD. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. *Curr Opin Microbiol* 2006;9:374–80.
- Tuikue Ndam NG, Salanti A, Bertin G, *et al*. High level of var2csa transcription by *Plasmodium falciparum* isolated from the placenta. *J Infect Dis* 2005;192:331–5.
- Moussiliou A, Alao MJ, Denoed-Ndam L, *et al*. 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;211:1484–8.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, *et al*. The pathogenic basis of malaria. *Nature* 2002;415:673–9.
- Tuikue Ndam N, Deloron P. Towards a vaccine against pregnancy-associated malaria. *Parasite* 2008;15:515–21.
- Bertin GI, Sabbagh A, Argy N, *et al*. Proteomic analysis of *Plasmodium falciparum* parasites from patients with cerebral and uncomplicated malaria. *Sci Rep* 2016;6:26773.
- White NJ, Turner GD, Day NP, *et al*. Lethal malaria: Marchiafava and Bignami were right. *J Infect Dis* 2013;208:192–8.
- Berendt AR, Turner GD, Newbold CI. CM: the sequestration hypothesis. *Parasitol Today* 1994;10:412–4.
- Clark IA, Cowden WB, Rockett KA. The pathogenesis of human cerebral malaria. *Parasitol Today* 1994;10:417–8.
- Beare NA, Harding SP, Taylor TE, *et al*. Perfusion abnormalities in children with cerebral malaria and malarial retinopathy. *J Infect Dis* 2009;199:263–71.
- Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, *et al*. The neuropathology of fatal cerebral malaria in Malawian children. *Am J Pathol* 2011;178:2146–58.
- McDonough A, Weinstein JR. Neuroimmune response in ischemic preconditioning. *Neurotherapeutics* 2016;13:748–61.
- Kim E, Cho S. Microglia and monocyte-derived macrophages in stroke. *Neurotherapeutics* 2016;13:702–18.
- Xia CY, Zhang S, Gao Y, *et al*. Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *Int Immunopharmacol* 2015;25:377–82.
- Kumar A, Barrett JP, Alvarez-Croda DM, *et al*. NOX2 drives M1-like microglial/macrophage activation and neurodegeneration following experimental traumatic brain injury. *Brain Behav Immun* 2016;58:291–309.
- Pino P, Taoufiq Z, Nitcheu J, *et al*. Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost* 2005;94:336–40.
- Postma NS, Mommers EC, Eling WM, *et al*. Oxidative stress in malaria; implications for prevention and therapy. *Pharm World Sci* 1996;18:121–9.
- Eisenhut M. The evidence for a role of vasospasm in the pathogenesis of cerebral malaria. *Malar J* 2015;14:405.
- Eisenhut M. Vasospasm in cerebral inflammation. *Int J Inflamm* 2014;2014:1–14.
- O'Brien NF, Mutatshi Taty T, Moore-Clingenpeel M, *et al*. Transcranial doppler ultrasonography provides insights into neurovascular changes in children with cerebral malaria. *J Pediatr* 2018;203:116–24.
- Bertin GI, Lavstsen T, Guillonnet F, *et al*. Expression of the domain cassette 8 *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1 is associated with cerebral malaria in Benin. *PLoS One* 2013;8:e68368.
- Ponts N, Chung DW, Le Roch KG. Strand-specific RNA-seq applied to malaria samples. *Methods Mol Biol* 2012;883:59–73.
- Bertin GI, Sabbagh A, Guillonnet F, *et al*. 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;208:1987–97.
- Otto TD, Wiliński D, Assefa S, *et al*. New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Mol Microbiol* 2010;76:12–24.
- Varet H, Brilllet-Guéguen L, Coppée JY, *et al*. SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq Data. *PLoS One* 2016;11:e0157022.
- van Buuren S, Boshuizen HC, Knook DL. Multiple imputation of missing blood pressure covariates in survival analysis. *Stat Med* 1999;18:681–94.
- Idro R, Kakooza-Mwesige A, Asea B, *et al*. Cerebral malaria is associated with long-term mental health disorders: a cross sectional survey of a long-term cohort. *Malar J* 2016;15:184.

© 2019 Author(s) (or their employer(s)) 2019. Re-use permitted under CC BY-NC. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ. This is an open access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited, appropriate credit is given, any changes made indicated, and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>. Notwithstanding the ProQuest Terms and Conditions, you may use this content in accordance with the terms of the License.