

## **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 monocytaire 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 CEs 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 CEs ne suffit pas à elle seule à induire la production de biomarqueurs d'activation par les CEs.

Concernant l'impact du neuropaludisme sur la réponse monocytaire, 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 TNF $\alpha$ , 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  $\geq 57.5$  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 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 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  $\geq 57.5$  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.